

Wirkung von ionisierender Strahlung auf Proteom und Lipidom sowie auf zelluläre und mitochondriale Aktivität



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Lidija Cavlovic
aus Sanski Most, Bosnien und Herzegowina

Referent:	Prof. Dr. Norbert A. Dencher
Korreferent:	Prof. Dr. Boris Schmidt
Tag der Einreichung:	11. Mai 2015
Tag der mündlichen Prüfung:	13. Juli 2015

Darmstadt 2015

D17



Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. N. A. Dencher in der Zeit von April 2011 bis April 2014 im Fachbereich Chemie am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt. Gefördert wurde diese Arbeit von der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare und zelluläre Reaktionen auf ionisierende Strahlung“ (GRK 1657).



*Sa ljubavlju i zahvalnošću posvećeno
mojim roditeljima*

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet
meinen Eltern



Danksagung

Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher danke ich für seine kompetente Betreuung, die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie seine fachliche Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Schmidt möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs, GRK 1657, für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie für anregende Diskussionen, die mich in meiner Arbeit oft inspirierten.

Manuela Kratochwil und Sven Marx, sowie Dr. Stefan Lehr, Dr. Sonja Hartwig und Waltraud Passlack danke ich für die Durchführung der Messungen am MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer zur Identifizierung der Proteine.

Bei Christine und Stefanie Kern, sowie bei Michael Muschol möchte ich mich bedanken für die Daten der Lipidom-Analytik.

Vielen Dank an Meral Azakli und Christine Kern für ihre geleistete Hilfe im Rahmen ihrer, von mir betreuten, Masterarbeiten.

Frau Christine Schröpfer und Frau Sabine Reinhold danke ich für ihre motivierenden und aufheiternden Gespräche, sowie ihrer ständigen Hilfsbereitschaft im Labor und Büro.

Bedanken möchte ich mich auch bei Viktoria Decker für die tolle Zusammenarbeit in unserem kleinen Zellkulturlabor.

Der gesamten Arbeitsgruppe Dencher, allen bereits erwähnten Mitgliedern, wie auch: Holger Seelert, Elizabeth Trapp, Michaela Fröhlich, Sandra Thilmany, Monika Frenzel, Eva Regine Schäfer, Nico Heidrich, Katarzyna Kuter, Tamara Dzinic danke ich für die freundliche und harmonische Arbeitsatmosphäre, die während der gesamten Zeit herrschte. Vielen Dank noch für die schönen Pausen und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

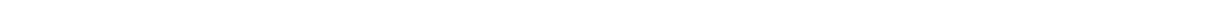
Bei meinem Onkel Goran und meiner Tante Christa, aber auch bei meiner ganzen Familie möchte ich mich herzlich bedanken für die Hilfe immer wenn es nötig war.

Meinem Freund Ivo danke ich für seine langjährige Unterstützung, sowie seine Geduld und Liebe, die er mir auch in schwierigen Zeiten hat zukommen lassen.

Auch meinen Geschwistern Livio (und Ivana), Ivana, Dario, Daria, Josip und Kristian und meinen Nichten Valentina und Ana danke ich für die Unterstützung und die Liebe, die mein Leben immer wieder mit Freude erfüllen.



Bei meinen Eltern Ivo und Vesna möchte ich mich für die bedingungslose Unterstützung, Liebe und vieles mehr bedanken. Ihnen gilt mein besonderer Dank. Ich liebe Euch.
(bosnisch: *Mojim roditeljima Ivi i Vesni želim da se zahvalim za njihovu bezuvjetnu podršku, ljubav i još mnogo više. Njima ide moja posebna zahvalnost. Volim vas.*)







Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	5
2.1 Mitochondrium.....	5
2.2 Physikalische und biologische Eigenschaften ionisierender Strahlung	10
2.3 Sauerstoff: Elixier des Lebens und Gift und seine Rolle bei der zellulären Strahlungsantwort	15
2.4 Zielsetzung.....	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
3.1.2 Chemikalien.....	25
3.1.3 Programme und Software.....	27
3.1.4 Darstellung der Daten und Statistik.....	28
3.1.5 Zelllinie	28
3.2 Zellbiologische Methoden.....	29
3.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	29
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl	29
3.2.3 Kultivierung von Zellen	29
3.2.4 Kultivierung von Zellen unter Hypoxie nachahmenden Bedingungen.....	30
3.2.5 Bestrahlung von Zellen	30
3.2.6 Ernte der Zellen	31
3.3 Protein-Analytische Methoden.....	31
3.3.1 Isolierung von Mitochondrien	31
3.3.2 Ermittlung der Proteinkonzentration mittels Roti® Nanoquant.....	32

3.3.3	Solubilisierung von mitochondrialen Proteinen.....	33
3.3.4	Blau-native Elektrophorese	33
3.3.4.1	Blau-native Gele	34
3.3.4.2	Auftragung von Proben und Durchführung der Elektrophorese	34
3.3.5	Coomassie Blue Färbung der Gele	35
3.3.6	In-Gel Aktivitätstests	35
3.3.6.1	Komplex I	35
3.3.6.2	Komplex IV	36
3.3.6.3	Densitometrische Auswertung der Aktivität	36
3.3.7	2D BN/SDS Elektrophorese	37
3.3.7.1	2D-Gele und Auftragung von Proben	37
3.3.8	SYPRO Ruby Färbung von Gelen	37
3.3.9	Auswertung von 2D Gelen	38
3.3.10	Silber-Färbung von Gelen	38
3.3.11	Identifizierung der Proteine mit Hilfe der 2D Elektrophorese und PMF Massenspektroskopie	38
3.4	Lipid-Analytische Methoden.....	39
3.4.1	Fluoreszenz-Anisotropie	39
3.4.2	Qualitative Lipidanalyse mit Hilfe MALDI TOF MS	40
3.5	Methoden zur Analyse der zellulären und mitochondrialen Aktivitäten.....	40
3.5.1	ATP-Bestimmung.....	41
3.5.2	ROS-Detektion.....	41
3.5.3	Messungen von mitochondrialem Membranpotential	42
3.5.4	Wachstumsanalyse der unbestrahlten und bestrahlten Zellpopulationen	42
3.5.5	Alamar-Blue Assay	43
3.5.6	Neutralrot Assay	43
4	Ergebnisse und Diskussion	44
4.1	Protein-Analysen	44

4.1.1	Identifizierung der Proteine	45
4.1.2	Quantitative Analyse der Proteinmenge in Abhängigkeit von Bestrahlung	54
4.1.2.1	Proteine der Atmungskette	55
4.1.2.2	Hitzeschockproteine	89
4.1.3	Enzymaktivität des Komplexes I der Atmungskette.....	97
4.1.4	Enzymaktivität des Komplexes IV der Atmungskette	104
4.2	Membran-analytische Untersuchungen von Strahlungseffekten	111
4.2.1	Analyse der Membranfluidität mittels Fluoreszenz-Anisotropie	112
4.2.1.1	Effekt von ionisierender Strahlung auf die mitochondrialen Membranfluidität in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung	113
4.2.1.2	Effekt der ionisierender Strahlung auf die Fluidität der Zellmembran	116
4.2.1.3	Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Fluidität der mitochondrialen Membranen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl ₂	118
4.2.2	Strahlungseffekte auf die Lipidzusammensetzung von mitochondrialen Membranen	122
4.3	Zelluläre und mitochondriale Aktivität unter dem Einfluss von ionisierender Strahlung.....	128
4.3.1	Analyse von ROS Menge in den OLN-93 Zellen	128
4.3.2	Mitochondriales Membranpotential	131
4.3.3	Energiestatus von Zellen	133
4.3.4	Wachstumsanalyse der Zellpopulation.....	139
4.3.5	Metabolische Aktivität von Zellen	141
4.3.6	Endozytosolische Aktivität von Zellen	142
5	Zusammenfassende Diskussion.....	145
5.1	Effekte ionisierender Strahlung.....	146
5.1.1	Effekte ionisierender Strahlung auf die Proteine der Atmungskette.....	146
5.1.2	Effekte ionisierender Strahlung auf die Hitzeschockproteine.....	149
5.1.3	Die Effekte ionisierender Strahlung auf die Lipide.....	150

5.1.4	Effekte ionisierender Strahlung auf physiologische Aktivitäten der Zellen	153
5.2	Effekte von CoCl_2 auf Strahlungsantwort: Hypoxie-nachahmende Bedingung? ...	157
Anhang	IX
Literaturverzeichnis	XVII
Tagungsbeiträge	XXIX
Erklärung	XXXI
Erklärung	XXXIII
Lebenslauf	XXXV

Abkürzungsverzeichnis

(w/w)	Massenverhältnis
1.D	1. Dimension
2.D	2. Dimension
2D-BN/SDS- PAGE	zweidimensionale Blau-Native / Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Akt	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BN	Blau-Nativ
BN-PAGE	Blau-Native- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CoCl ₂	Cobalt-Dichlorid
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ErbB2	<i>Receptor tyrosine-protein kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fmol	Femtomol
GRK	Graduiertenkolleg
Gy	Gray
H x B x D	Höhe x Breite x Dicke
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1, α Untereinheit
HIF-1 β	Hypoxie-induzierter Faktor 1, β Untereinheit
HMW	<i>high molecular weight</i>
HSP	Hitzeschockprotein
Hyou1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
kDa	Kilo-Dalton
LET	lineare Energietransfer
LMW	<i>low molecular weight</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MS	Massenspektrometrie
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
nmol	Nanomol
O ₂	Sauerstoff
OxPhos	oxidative Phosphorylierung
P/S	Pencillin/Streptomycin

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PHD	Prolyl-Hydroxylase
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
pVHL	Von Hippel–Lindau Tumorsuppressor
RACK1	<i>receptor of activated protein kinase C</i>
Raf-1	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RBE	<i>relative biological effectiveness</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sv	Sievert
TMA-DPH	1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene
V ₁	Komplex V Monomer
V ₂	Komplex V Dimer
z. B.	zum Beispiel





1 Zusammenfassung

Die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die nukleare DNA (nDNA) und die daraus resultierenden Schäden und ihre Reparatur sind, verglichen zu der Wirkung auf die mitochondriale DNA (mtDNA), zellulären Proteine oder auch Lipide und die sich daraus ergebende zelluläre Antwort, umfassender erforscht und verstanden (Leach et al., 2001). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Untersuchung von zellulärer Strahlungsantwort, insbesondere der von Mitochondrien. Als experimentelles Modellsystem dienten immortalisierte Oligodendrozyten aus Rattenhirn, OLN-93. Dabei wurde die Wirkung von ionisierender Strahlung in den ersten 14 Tagen nach Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 8 Gy analysiert. Alle analysierten strahlungsinduzierten Wirkungen wurden stets in einen Vergleich zu entsprechenden unbestrahlten Proben gestellt und diskutiert. Die Untersuchungen umfassten zum einen die Analysen von mitochondrialem Proteom und Lipidom und zum anderen Analysen der physiologischen Merkmale der Zellen, die bekanntlich u.a. mitochondrial gesteuert werden.

Die Proteomanalyse erfolgte an nativ isolierten Mitochondrien. Bei der angewandten „*crude*“ Isolierungsmethode wurde als Priorität die Aufrechterhaltung von strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Mitochondrien und ihren Proteinen gelegt. Somit traten bei nachfolgenden Analysen des mitochondrialen Proteoms als Kontamination ebenfalls nicht mitochondriale Proteine auf. Die Proteomanalyse umfasste:

- a) Massenspektrometrische Identifizierung von, mittels 2D-BN/SDS Elektrophorese aufgetrennten, Proteinen,
- b) Die densitometrische Auswertung von Proteinspots auf 2D-BN/SDS Gelen und die Analyse der relativen Proteinmenge in Abhängigkeit von der Bestrahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy) der Zellen und
- c) Analyse der Aktivität von Komplex I und IV in ihrer individuellen und superkomplexen Form mittels In-Gel Aktivitätstests.

Die mittels massenspektrometrischer *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) Methode durchgeführte Identifizierung von Proteinen aus mitochondrialen Proben von OLN-93 Zellen in 2D-BN/SDS Gel lieferte, im Anbetracht der allgemein gültigen Schwierigkeiten die bei den Zellkulturproben auftreten (im Vergleich zu Gewebeproben bei gleicher Proteinmenge ist die Anzahl der Proteinspots deutlich kleiner und diese sind wesentlich schwächer sichtbar nach jeglichen Färbeverfahren), ausgesprochen zufriedenstellende Resultate. Insgesamt 98 Proteine wurden aus dem Gel extrahiert und analysiert. Erfolgreich war die Identifizierung

von 63 Proteinspots, darunter erwiesen sich 27, laut der Datenbank, als mitochondriale Proteine.

Die quantitative Analyse der Proteinmenge wurde für einige OxPhos- und Hitzeschockproteine (HSP) durchgeführt. Die densitometrische Auswertung der SYPRO-Ruby gefärbten Proteinspots auf 2D-BN/SDS Gelen erfolgte mittels Delta2D Software. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ionisierende Strahlung einen reduzierenden Einfluss auf die Menge der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung hat. Im Falle von HSPs zeigte sich strahlungsabhängig die Zunahme der Menge für das HSP60 und HSP90 β Protein, während die Menge vom Hsp70 (Mitglied der HSP70 Proteinfamilie) unbeeinflusst blieb. Die aufgetretenen Änderungen waren stets ausgeprägter zu den analysierten Zeiten, die näher an dem Zeitpunkt der Bestrahlung lagen (Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung).

Weiterhin wurde die Wirkung von ionisierender Strahlung auf das mitochondriale Proteom bei den Untersuchungen der enzymatischen Aktivität der Komplexe I und IV beobachtet. Dabei zeigte sich eine Abnahme der relativen Enzymaktivität für den individuellen Komplex I, sowie für den Komplex I in den Superkomplexen. Die Abnahmen waren dabei für den individuellen Komplex stärker ausgeprägt. Die relative enzymatische Aktivität vom Komplex IV war dagegen strahlungsabhängig erhöht. Die Erhöhung der relativen enzymatischen Aktivität war für Komplex IV in Superkomplexen größer als für den individuellen Komplex.

Die Untersuchung der Wirkung von ionisierender Strahlung auf das mitochondriale Lipidom erfolgte durch:

- a) Analyse der Membranfluidität mittels Fluoreszenz-Anisotropie der in der Membran befindlichen Fluoreszenzsonden und
- b) MALDI-TOF MS Analyse der Membran-Lipidzusammensetzung an intakten Mitochondrien.

Es zeigte sich bei der Analyse der „Fluidität“ der mitochondrialen Membranen statistisch signifikante Wirkung von ionisierender Strahlung. Dabei blieb diese strahlungsinduzierte Änderung für die gesamte Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung bestehen. Die Anisotropie-Werte der bestrahlten Proben waren durchschnittlich um 0,02 niedriger als die von unbestrahlten Proben, was eine strahlungsinduzierte Erhöhung der Membranfluidität widerspiegelt. Diese Änderungen konnten als ein für die Mitochondrien spezifischen Effekt der ionisierenden Strahlung beobachtet werden, denn die Analysen der Fluidität der Zellmembran ergaben keine strahlungsabhängige Unterschiede.

Die ionisierende Strahlung scheint keinen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen zu haben. Dies konnte während der Zusammenarbeit mit Frau

Stefanie Kern (Kern, 2013b) und Herrn Michael Muschol (Muschol, 2014) im Rahmen der Etablierung der innovativen massenspektrometrischen Methode zur Analyse der Lipidzusammensetzung an intakten Mitochondrien gezeigt werden.

Um die zellulären und mitochondrialen Aktivitäten zu untersuchen, erfolgte eine Reihe von Experimenten, die alle entweder durchgehend über die analysierte Zeitspanne, oder nur zu bestimmten Zeitpunkten strahlungsinduzierte Änderungen zeigten. So konnte eine mit der Zeit nach der Bestrahlung kleiner werdende Zunahme in der ATP Menge in bestrahlten Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet. Eine dritte Wiederholung ergab allerdings nur eine Zunahme der ATP Menge für den Tag 1 nach der Bestrahlung, während bei späteren Zeiten die ATP Menge strahlungsabhängig unbeeinflusst blieb. Weiterhin wurden eine Zunahme der ROS Menge und eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials am Tag 1 nach der Bestrahlung beobachtet, aber auch zu anderen Zeiten nach der Bestrahlung zeigten sich strahlungsinduzierte Änderungen. Die ionisierende Strahlung wirkte sich außerdem auf das Wachstum der Zellpopulation, sowie auf zelluläre metabolische und endozytosolische Aktivitäten aus.

Einen umstrittenen Parameter bei den Strahlungsstudien in konventionell *in vitro* kultivierten Zellen stellt der Sauerstoffgehalt dar. Um die Bedeutung von Sauerstoffgehalt auf die Strahlungsantwort der Zellen in solchen Studien zu erforschen, werden oft u.a. chemische Hypoxie-Nachahmer eingesetzt. In Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente ebenfalls unter Einsatz von dem in der Literatur bekannten chemischen Hypoxie-Nachahmer CoCl_2 durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung von ionisierender Strahlung abhängig von der Zugabe von 300 μM CoCl_2 zum Nährmedium analysiert. Weiterhin wurden die gefundenen Effekte des CoCl_2 auf die Strahlungsantwort kritisch in Vergleich gezogen mit den aus der Literatur bekannten Effekten der realen Hypoxie (tatsächlich verminderter Sauerstoffgehalt). Die Ergebnisse zeigten, dass CoCl_2 einen mildernden bzw. umkehrenden Effekt auf die Strahlungsantwort der Zellen hat. Bei der Analyse der mitochondrialen Membranfluidität wurde festgestellt, dass die strahlungsinduzierte Erhöhung in CoCl_2 behandelten Zellen nicht auftrat. Weiterhin konnte die beobachtete strahlungsinduzierte Erhöhung der ROS Menge, wie auch von dem mitochondrialen elektrochemischen Potential in Gegenwart von CoCl_2 nicht detektiert werden. CoCl_2 hatte einen Effekt auf die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen, unabhängig von der Aussetzung der Zellen ionisierender Strahlung. Im Vergleich zu vielen früheren Studien zur Analyse der Wirkung der realen Hypoxie auf die Strahlenresistenz kann gesagt werden, dass der mildernde und umkehrende Einfluss von CoCl_2 mit diesen teilweise in Einklang steht. Auf molekularer Ebene bewirkt

CoCl₂ die Inhibierung von Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) mit der Folge der Stabilisierung des HIF-1 Transkriptionsfaktors, welcher wiederum zur Aktivierung zahlreicher Gene führt und somit u.a. Strahlenresistenz bewirken kann. Die reale Hypoxie führt zur Stabilisierung von HIF-1 Transkriptionsfaktor, außer durch die Inaktivierung von PHDs, noch über mehrere Ebenen und erhöht dazu seine Translation und Transaktivierungsaktivität. Aus diesen Gründen und aufgrund zum Teil unbekannten Hypoxie-unähnlichen Einflüssen von CoCl₂ auf die Zellen kann zusammenfassend die Benutzung von CoCl₂ als Hypoxie-Nachahmer als ungeeignet angesehen werden.

Kernaussagen dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

Die ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy) beeinflusst viele der in dieser Arbeit untersuchten Parameter.

Die Mitochondrien stellen ein sehr wichtiges Target für die ionisierende Strahlung dar und in Anbetracht ihrer vielseitigen Einflüsse und Involvierung in die Steuerung der zellulären Prozesse (Apoptose, ATP Produktion, usw.), beeinflussen diese die gesamte zelluläre Antwort auf die Strahlung, aber auch auf andere Stressfaktoren.

Die konventionelle *in vitro* Kultivierung von Zellen ist, insbesondere aufgrund des erhöhten Sauerstoffgehalts, kritisch zu betrachten. Die Untersuchungen der zellulären Antwort auf die low-LET Strahlung, zu der auch Röntgenstrahlungen zählen, sollen unter möglichst physiologischen Sauerstoffbedingungen durchgeführt werden, da diese zum größten Teil die Zellen durch indirekte Wirkung schädigen. Diese Schäden sind häufig, abhängig von dem zellulären Sauerstoffgehalt, für die Zellen apoptotisch (irreparabel) oder reparabel.

2 Einleitung

2.1 Mitochondrium

„Hold somebody’s hand and feel its warmth. Gram per gram, it converts 10 000 times more energy per second than the sun. You find this hard to believe? Here are the numbers: an average human weighs 70 kilograms and consumes about 12 600 kilojoules / day; that makes about 2 millijoules / gram x second, or 2 milliwatts / gram. For the sun it’s miserable 0.2 microjoules / gram x second. Some bacteria, such as the soil bacterium “Azotobacter” convert as much as 10 joules / gram x second, outperforming the sun by a factor of 50 million. I am warm because inside each of my body cells there are dozens, hundreds or even thousands of mitochondria that burn the food I eat“ (Schatz, 2006).

Dieses Zitat beschreibt eine der Funktionen von Mitochondrien und verleiht ihrer oft benutzten Bezeichnung „Kraftwerke der Zelle“ alle Ehre. Hierbei geht es um die längst bekannte Aufgabe der Mitochondrien, die ATP Produktion zur Energiebereitstellung für die verschiedenen zellulären Prozesse. In dem Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung erzeugen die Mitochondrien den Großteil des energieliefernden ATP, das für das Überleben wie auch für den Zelltod notwendig ist. Neben Cytratzyklus und oxidativer Phospholierung enthalten Mitochondrien die Enzyme für eine Reihe von weiteren Stoffwechselwegen, wie dem Fettsäureabbau, die Pyrimidin-, Nukleotid- und Häm-Biosynthese, die Lipidsynthese, dem Harnstoffzyklus und die Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern (Scheffler, 2001). Außer in diesen Stoffwechselprozessen sind die Mitochondrien noch an weiteren Aufgaben in der Zelle beteiligt. So sind sie u. a. ein intrazellulärer Ca^{2+} -Speicherort und an der damit zusammenhängenden Ca^{2+} -Signaltransduktion beteiligt (O'Rourke and Blatter, 2009). Auch bei der Einleitung der Apoptose und Nekrose, bei den Signalkaskaden des oxidativen Stresses (Fernandez and Perl, 2009; Galluzzi et al., 2012), Zellzyklusregulation, zellulären Differenzierung sowie dem Zellwachstum (Mason and Rathmell, 2011) spielen die Mitochondrien eine wichtige Rolle.

Aufgrund dieser zentralen Funktionen ist es nicht überraschend, dass eine Reihe von Krankheiten beim Menschen durch die Dysfunktionen von Mitochondrien verursacht wird. Das sind in erster Linie neurologische oder muskuläre Erkrankungen (Che et al., 2013) sowie verschiedene Formen von Krebs (Tan et al., 2013) und Alterungsprozesse (Dencher et al., 2007), aber auch Diabetes und Fettleibigkeit (Blake and Trounce, 2013). In der Abbildung 1 sind Beispiele für die Krankheiten, die im Zusammenhang mit mitochondrial angeleiteter Apoptose der Zellen stehen, aufgeführt.

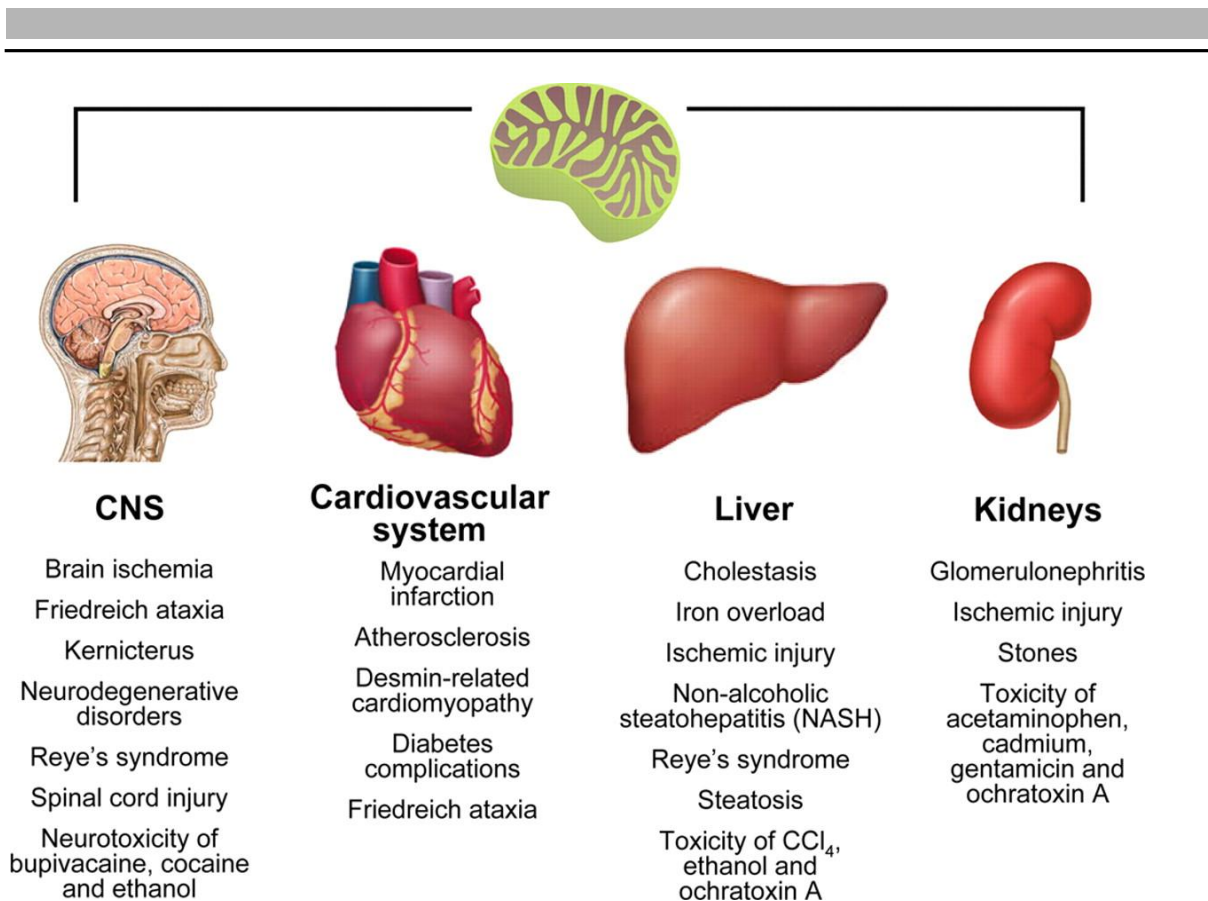


Abbildung 1: Beispiele für akute und chronische Erkrankungen die im Zusammenhang mit mitochondrial-induziertem pathologischem Zellabsterben (mitochondrial-induzierte Apoptose) in Geweben stehen. CNS: zentrales Nervensystem (Kroemer et al., 2007).

Die Morphologie der Mitochondrien kann sich je nach Zelltyp und physiologischem Zustand unterscheiden. Entweder sind diese als tausende individuelle stäbchenförmige Organellen, oder als ein zusammenhängendes tubuläres dynamisches Netzwerk organisiert (siehe Abbildung 2), welcher ständig verschmilzt und sich wieder teilt („*fusion*“ und „*fission*“).

Mitochondrien sind von zwei Membranen umgeben, einer äußeren und einer inneren Membran, zwischen denen sich der Intermembranraum befindet. Die innere Membran umschließt die mitochondriale Matrix. Mitochondrien weisen weitere strukturelle Merkmale auf, die sie von den anderen Zellkompartimenten unterscheiden lässt und ihnen die vielfältige Funktionalität verleiht.

- a) Anders als die anderen Organellen enthält das Mitochondrium eigene zirkuläre doppelsträngige DNA, welche ca. 1% von der gesamten DNA einer humanen Zelle ausmachen kann. Humane mitochondriale DNA (mtDNA) ist aus 16 569 bp aufgebaut und befindet sich in der Matrix in einer variable Anzahl von mtDNA-Molekülen mit ungefähr zwei bis zehn Kopien, wobei in einer Zelle über 1 000 Mitochondrien vorliegen können. Die meisten mitochondrialen Proteine sind dennoch kodiert in der nuklearen DNA (humane nukleare DNA ist $3,1 \times 10^9$ bp groß (Dolezel and Greilhuber,

2010)). Die Analysen des mitochondrialen Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass ungefähr 10% der nuklearen Gene mitochondriale Proteine kodieren (Andersson et al., 2003). Die mtDNA trägt die Gene für 13 Polypeptide die in die oxidative Phosphorylierung involviert sind, sowie für zwei rRNAs und 22 tRNAs (Prithivirajsingh et al., 2004). Eine wichtige Besonderheit der mtDNA verglichen zu nuklearer DNA ist, dass sie annähernd vollständig kodierend ist, während die kodierenden Bereiche der nukleare DNA nur ca. 3 % betragen. Die mtDNA komplexiert, anders als die nukleare DNA, nicht mit schützenden Histonen, liegt aber in der Matrix zu mehreren Kopien assoziiert mit einigen Proteinen, die an der Replikation und Transkription von mtDNA involviert sind, als Nucleoid vor (Taylor and Turnbull, 2005). Weiterhin sind die mtDNA-Reparaturprozesse weniger effizient als die im Nukleus. Aus diesen Gründen sind Gendefekte mit direktem biologischem Effekt wahrscheinlicher nach Schäden in mtDNA als in nukleare DNA (Kam and Banati, 2013). Die Vererbung der mtDNA erfolgt ausschließlich maternal, da paternale Mitochondrien nach der Befruchtung der Eizelle ubiquitiniert und abgebaut werden (Sutovsky et al., 1999).

- b) Die äußere und innere Mitochondrienmembranen sind sehr unterschiedlich. Die äußere Membran ist deutlich proteinärmer (Protein/Lipid = 1/1,5 (w/w)) und ist versehen mit, durch das Protein Porin, gebildeten Poren, welche den Austausch von Molekülen bis zu ca. 10 kDa zwischen Zytoplasma und Intermembranraum erlauben. In der äußeren mitochondrialen Membran sind außerdem weitere Transportproteine lokalisiert. In den letzten Jahren konnten Zusammenhänge zwischen diesen mitochondrialen Kompartiment und wichtigen zellulären Prozessen wie z. B. Apoptose gefunden werden, da die äußere mitochondriale Membran als ein Interaktionspartner von einigen pro- und anti-apoptotischen Faktoren identifiziert ist. Die innere mitochondriale Membran ist dagegen besonders proteinreich (Protein/Lipid = 5-6/1 (w/w)) und undurchlässig für hydrophile Substanzen (Walther and Rapaport, 2009). Hier befinden sich die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung und zahlreiche Transportproteine, die für den Im- und Export wichtiger Substrate und Proteine sorgen. Der Transport durch die innere Membran ist stark selektiv kontrolliert und gesteuert.
- c) Die Atmungskettenkomplexe, die für den Aufbau des elektrochemischen Potentials zuständig sind, können in der inneren mitochondrialen Membran in ihrer individuellen Form, aber auch als Superkomplexe vorliegen. Als Superkomplexe bezeichnet man die supermolekularen Organisationen die durch die stöchiometrische Assemblierung von einzelnen Atmungskettenkomplexen entstehen. Die Organisation der

Atmungskettenkomplexe in Superkomplexe konnte in allen untersuchten Organismen, von Bakterien bis zu Säugern, nachgewiesen werden (Dencher et al., 2007; Frenzel, 2011; Frenzel et al., 2010; Krause, 2006; Krause and Seelert, 2008; Muschol, 2014; Reifschneider et al., 2006; Schafer et al., 2007; Schafer et al., 2006; Schagger and Pfeiffer, 2000; Seelert et al., 2009; Thilmany, 2013; Wittig et al., 2006). Bis heute wurden in Säugerzellen keine Superkomplexe mit Komplex II identifiziert. Komplex V (ATP Synthase) wurde bis heute ebenfalls nicht in Assemblierungsformen mit anderen Atmungskettenkomplexen beobachtet. Allerdings bildet Komplex V Homooligomere. Die Formation von solchen supermolekularen Organisationen erhöht die spezifische Enzymaktivität der einzelnen Komplexe und sorgt für die räumliche Nähe der einzelnen Enzyme die in der Atmungskette beteiligt sind (Schafer et al., 2006).

- d) Neben der ATP Produktion findet während der oxidativen Phosphorylierung an den Komplexen I und III₂ die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, ROS (engl. *reactive oxygen species*) statt. Etwa 0,2 % des mitochondrialen Sauerstoffs wird zu ROS umgewandelt (Boveris et al., 1972). ROS verursacht Schädigungen der Mitochondrien durch Mutationen der mitochondrialen DNA, Peroxidationen der Membranlipide und oxidative Modifikationen von Proteinen. Die Mitochondrien sind ausgestattet mit komplexen antioxidativen Systemen, welche unter physiologischen Bedingungen diese mitochondrialen Biomoleküle vor oxidativen Schäden schützt. Andererseits sind ROS nicht nur als ein unerwünschtes Nebenprodukt der Atmungskette anzusehen, da diese ebenfalls, in eine kontrollierte Menge, als Signalmoleküle von essentieller Bedeutung sind. Allerdings konnten im Verlauf des Alterungsprozesses, sowie im Zusammenhang mit vielen Krankheiten bereits die Akkumulationen von ROS-induzierten oxidativen Schäden an Makromolekülen beobachtet werden. Dabei sind die Mitochondrien sowohl als Hauptquelle für ROS wie auch als das Hauptziel für deren Schädigungen identifiziert worden.
- e) Die innere mitochondriale Membran enthält zu einem hohen Anteil das Phospholipid Cardiolipin. Anders als die meisten anderen Phospholipiden ist Cardiolipin aus vier Fettsäure-Resten aufgebaut. Säuger-Cardiolipin trägt häufig vier Linolsäure-Reste (18:2 Fettsäure). Es sind bereits zahlreiche essenzielle Bedeutungen von Cardiolipin für die Mitochondrien und Zellen bekannt. Cardiolipin ist beteiligt an der Impermeabilität der inneren mitochondrialen Membran und somit auch an der Aufrechterhaltung vom elektrochemischen Potential und an der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung. Weiterhin stabilisiert Cardiolipin die in der Membran befindlichen Proteinstrukturen, wie z. B. Komplexe und Superkomplexe der

oxidativen Phosphorylierung und nimmt Einfluss auf ihre Funktionalität. (Chicco and Sparagna, 2007; Haines and Dencher, 2002; Kagan et al., 2013) Bei der oxidativen Phosphorylierung könnte Cardiolipin ebenfalls eine Funktion als Protonendonator (Protonenspeicher) einnehmen, wodurch es direkt in die ATP Synthese involviert wäre (Haines and Dencher, 2002). Die Oxidation von Cardiolipin ist einer der ersten Ereignisse bei der Einleitung der intrinsischen Apoptose. Die Veränderungen in der Abundanz und Struktur von Cardiolipin führen zur mitochondrialen Dysfunktionen (Chicco and Sparagna, 2007).

- f) Weiterhin wird vermutet, dass das Cardiolipin eine wichtige Rolle bei der Bildung von Einstülpungen (Cristae) der inneren mitochondrialen Membran einnimmt. Die Cristae dienen der Vergrößerung der Fläche der inneren Membran und sind in metabolisch aktiven Zellen besonders stark ausgeprägt (siehe Abbildung 2). Ebenfalls bei der Bildung der Cristae scheint die ATP-Synthase, durch die Assemblierung zu Homodimeren, beteiligt zu sein. So wird postuliert, dass durch den Winkel zwischen den ATP-Synthase Monomeren in der Dimerstruktur eine starke lokale Krümmung der Membran erfolgt (Giraud et al., 2002; Wittig et al., 2008). Der Anteil an OxPhos-Komplexen ist signifikant höher in den Cristae verglichen zu ungefalteten Abschnitten (*inner boundary membrane, IBM*) der inneren Membran (Mileykovskaya and Dowhan, 2009).

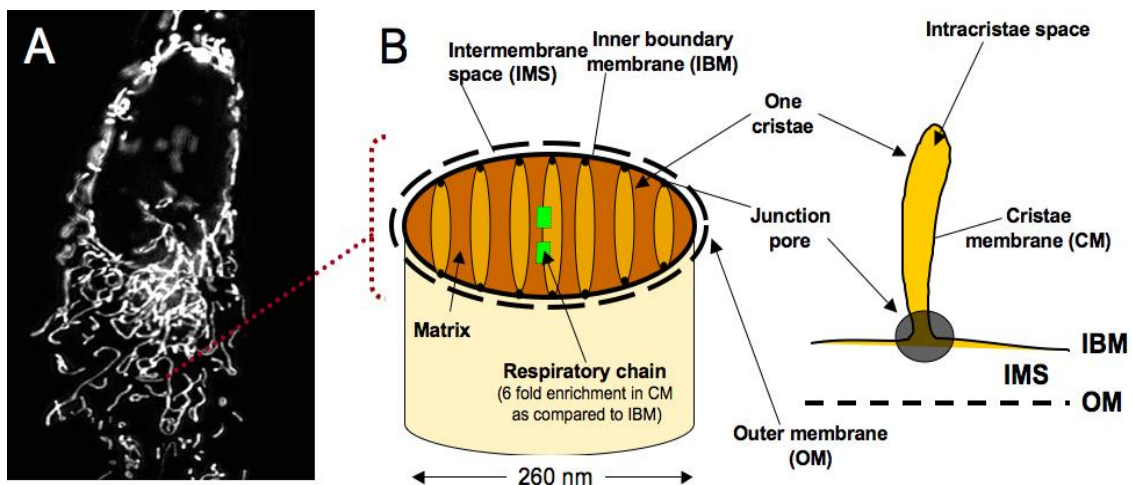


Abbildung 2: Mitochondriale Struktur. A: Mitochondrien sind organisiert als ein dynamisches Netzwerk (Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme einer HeLa Zelle; Mitochondrien sind durch in der Matrix exprimierte GFP visualisiert). B: Schematische Darstellung von Mitochondrium. IBM: *inner boundary membrane* (Bellance et al., 2009).

Diese oben beschriebenen strukturellen und funktionellen Merkmale stellen nur einen Teil der Erkenntnisse über die Mitochondrien dar. Weitere Besonderheiten sind z. B. die Existenz

eines völlig selbstständigen Apparats der Proteinbiosynthese in Mitochondrien (Kuzmenko et al., 2013) und Abweichungen vom universellen genetischen Code (Taylor and Turnbull, 2005). Zusammen mit weiteren spezifischen Merkmalen wie u. a. das Vorhandensein von mtDNA und Cardiolipin erlauben diese Besonderheiten die Bezeichnung von Mitochondrien als semiautonome Zellorganellen und sie stellen die Grundsteine bei der Entwicklung der sogenannte Endosymbionten-Hypothese. Aufgrund von Genom-Analysen vermuten viele Wissenschaftler, dass die Mitochondrien sich aus einem, in vorläufige eukaryotische Zellen aufgenommenen, α -Proteobakterium im Laufe der Evolution entwickelten (Andersson et al., 2003).

2.2 Physikalische und biologische Eigenschaften ionisierender Strahlung

Als ionisierender Strahlung wird die Strahlung, die beim Durchdringen von Materie die Moleküle/Atome durch „herausschlagen“ von Elektronen ionisiert, bezeichnet. Dazu gehören elektromagnetische Strahlen (Röntgen- und γ -Strahlung) und Teilchenstrahlung (α -, β -, Neutronen-, Schwerionen-, Elektronen- und Protonen-Strahlung). Verschiedene ionisierende Strahlungen unterscheiden sich stark in ihrer biologischen Wirksamkeit. Gründe für ihre unterschiedlichen Wirksamkeiten ergeben sich durch die unterschiedlichen Wege der Energieabsorption, bzw. Ionisation. Bei elektromagnetischer und Neutronen-Strahlung kann die Energieabsorption durch drei unterschiedliche Wege erfolgen. Bei dem so genannten „photoelektrischen“ Effekt findet die Ionisierung von Atomen durch die Entfernung von Elektronen aus inneren Elektronenschalen statt, wobei die gesamte Strahlenergie an das Elektron abgegeben wird. Bei der Ionisierung durch das Herausschlagen von Elektronen aus der äußeren Elektronschale spricht man von „Compton Effekt“. Hierbei finden eine teilweise Übertragung von Energie und die Ablenkung von der Strahlung statt. Deutlich seltener findet die Ionisierung durch „Paarbildung“ statt. Bei der Paarbildung werden ein Elektron und ein Positron durch die direkte Wechselwirkung von Strahlung mit einem Atomkern gebildet. Welcher Art der Ionisierung von Materie durch die elektromagnetische Strahlung erfolgt hängt von der Strahlungsenergie ab, wobei die Paarbildung bei Strahlung mit sehr hoher Energie vorkommt (Hall and Giaccia, 2006; Hartmann, 2014).

Bei der Wechselwirkung zwischen Materie und geladenen Teilchenstrahlungen kommt es zu so genannter „Coulomb-Wechselwirkung“, die entweder im Feld der Elektronschale oder im Feld des Atomkerns erfolgt. Die Wechselwirkung von allen Teilchenstrahlungen mit Materie ist abhängig von der Masse, Ladung und Geschwindigkeit des Teilchens (Hartmann, 2014; Weber, 1996).

Trotz diesen Unterschieden bleibt die Gemeinsamkeit aller dieser Strahlungsarten die Ionisierung der Atome/Materie durch die Abgabe der Energie. Die absorbierte Energie einer ionisierenden Strahlung pro Masseneinheit ist definiert als Dosis (D). Die Einheit der Dosis ist Gray [Gy] und ergibt sich aus der folgenden Beziehung (Hartmann, 2014):

$$D = \frac{abs.E}{m} \left[\frac{J}{kg} = Gy \right]$$

Formel 1: Absorbierte Strahlungsenergie (abs.E) pro Masse (m) ist definiert als Dosis (D).

Diese physikalisch korrekte Definition der Dosis berücksichtigt die unterschiedliche biologische Wirksamkeit von verschiedenen Strahlungsarten nicht. Aus diesem Grund wird vor allem bei Strahlenschutzthemen der Begriff Äquivalentdosis (H) benutzt (Hartmann, 2014).

$$H = D \times q [Sv]$$

Formel 2: Äquivalentdosis (H) kann als eine biologisch relevante strahlungsartabhängige Korrektur der Dosis (D) definiert werden. Die Berücksichtigung der Strahlungsart erfolgt durch den Koeffizient q (Bewertungsfaktor).

Der Bewertungsfaktor q berücksichtigt die unterschiedlichen biologischen Wirksamkeiten der einzelnen Strahlungsarten und ist einheitslos. Somit hat die Äquivalentdosis dieselbe Einheit wie die Dosis, Gray [Gy]. Gebräuchlich wird die Äquivalentdosis in Sievert [Sv] angegeben damit diese beiden Größen nicht verwechselt werden (Hartmann, 2014).

Aufgrund unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit einzelner Strahlungsarten wurde ebenfalls ein weiterer Parameter, die sogenannte „Relative Biologische Wirksamkeit“ (RBE, engl. *relative biological effectiveness*) eingeführt. Dieser Parameter ist definiert als Verhältnis der Dosen einer Referenzstrahlung (z.B. 250 kV Röntgenstrahlung) und der zu vergleichenden Strahlung, die zu einem gleichen Effekt führt (z. B. 10%-ige Überlebensrate).

$$RBE = \frac{D_{ref}}{D_x}$$

Formel 3: RBE, Relative Biologische Wirksamkeit ist definiert als Verhältnis von zwei Dosen die zu gleichem Effekt in einem biologischem System führt. Dabei bezieht man die Dosis der zu vergleichenden Strahlung (D_x) auf die Dosis einer Referenzstrahlung (D_{ref}).

Neben Unterschieden in den Arten der Wechselwirkung einzelner Strahlungsarten spielen bei der RBE noch die Energiedeposition, bzw. die Dichte der ionisierenden Ereignisse und das Bremsvermögen, bzw. der Strahlungsenergieverlust beim Durchgang durch Materie, wichtigen Rollen.

Das Maß für die Energiedeposition, bzw. die Dichte der ionisierenden Ereignisse ist Linearer Energietransfer (LET) und wird über die durch Materie absorbierte Energie entlang einer definierten Wegstrecke beschrieben.

$$LET = \frac{\Delta E}{\Delta s} \left[\frac{keV}{\mu m} \right]$$

Formel 4: Linearer Energietransfer (LET) beschreibt die durch die Materie absorbierte Energie (ΔE) einer Strahlung (ionisierender Ereignisse) über eine kurze Strecke (Δs) und ist somit das Maß für die Energiedeposition.

Die Strahlung, die entlang einer definierten Strecke dichte Ionisierung der Materie bewirkt, wird als high-LET Strahlung bezeichnet und besitzen eine höhere RBE. Konkret führen die high-LET Strahlungen bei Bestrahlung von Zellen zu lokal gehäuften und damit komplexeren Schäden (Roots et al., 1989). Dazu zählen u.a. Protonen- und Schwerionen-Strahlung wie z. B. Kohlenstoffionen-Strahlung. Dagegen erfolgt bei elektromagnetischer oder auch Elektronen-Strahlung eine homogene Verteilung von ionisierenden Ereignissen. Solche Strahlungen werden als low-LET Strahlung genannt (International Commission on Radiation Units and Measurements., 1970).

Die Protonenstrahlung und andere positiv geladene Teilchenstrahlungen, wie auch die Neutronenstrahlung geben ihre Energie in der Materie bei einer bestimmten Resonanzenergie ab. Das bedeutet, dass diese abhängig von der Ausgangsenergie mit geringen Energieverlusten tief in die Materie eindringen können, bevor sie die Wechselwirkung mit Materie eingehen und diese ionisieren. Die negativ geladenen Teilchen geben ihre Energie dagegen kontinuierlich, proportional zur Dichte der Materie ab. Mit Eindringtiefe in die Materie kann ein exponentieller Strahlenergieverlust bei elektromagnetischen Strahlungen beobachtet werden (Hartmann, 2014). Diese Eigenschaften der Strahlung werden als das Bremsvermögen, bzw. der Strahlenergieverlust beim Durchgang durch Materie bezeichnet und können anhand der Bragg-Kurve beschrieben werden. In der Abbildung 3 sind die Bragg-Kurven von elektromagnetischen Strahlungen im Vergleich zu der Bragg-Kurve von Kohlenstoffionen-Strahlung dargestellt. Die Kohlenstoffionen-Strahlung besitzt, wie auch Protonen- und andere positiv geladene Teilchenstrahlungen, einen sogenannten Bragg-Peak. Der Bragg-Peak beschreibt die bereits oben erwähnte ausgangsenergieabhängige Eigenschaft von einigen Strahlungsarten, die Materie mit minimalem Energieverlust zu passieren und die fast vollständige Energieabgabe bei einer bestimmten Resonanzenergie, bzw. bei einer bestimmten Eindringtiefe (Orecchia et al., 2009).

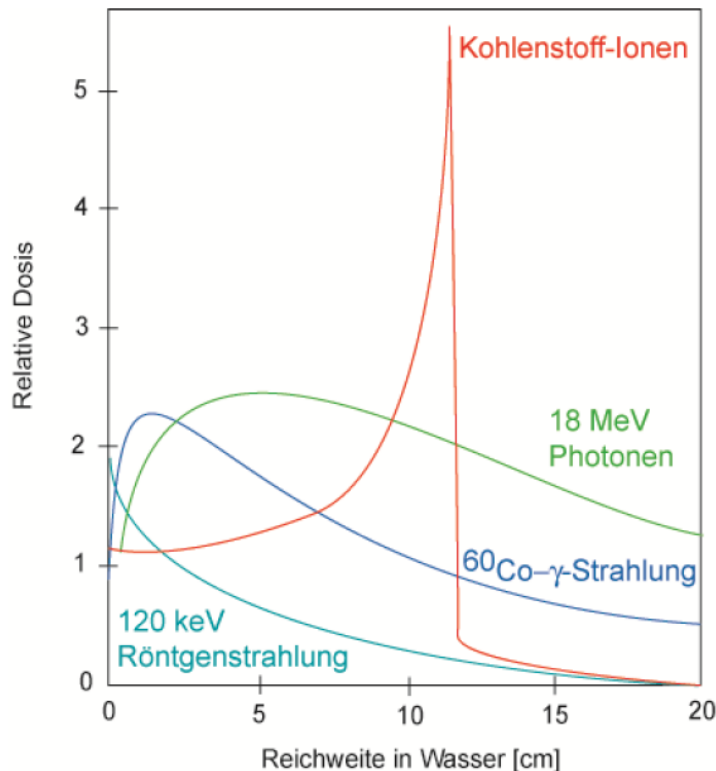


Abbildung 3: Bragg-Kurven von Kohlenstoffionen-Strahlung im Vergleich zu Bragg-Kurven von elektromagnetischen Strahlungen in Wasser. Kohlenstoffionen-Strahlung zeigt einen Bragg-Peak bei einer bestimmten Eindringtiefe. Diese bedeutet, dass die Kohlenstoffionen-Strahlung mit geringem Energieverlust eine bestimmte Reichweite in Materie/Wasser erreicht bei der annähernd die gesamte Energie abgegeben wird (Weber, 1996).

Die oben aufgeführten physikalischen Eigenschaften von unterschiedlichen Strahlungsarten sind besonders wichtig um biologische Systeme vor ionisierender Strahlung schützen zu können, oder aber um die Strahlung in der Medizin nutzen zu können. So z.B. hängt bei der Strahlentherapie die Wahl des Einsatzes einer Strahlungsart stark vom Ort des Tumorgewebes ab.

Die Schäden, die durch ionisierende Strahlung im Organismus, Gewebe oder in Zelle entstehen, sind qualitativ gleich unabhängig von der Strahlungsart. In einer Zelle entstehen durch ionisierende Strahlung direkte und indirekte Schäden. Als direkte Schäden bezeichnet man die Schäden an zellulären Molekülen die durch direkte Strahlenergieabgabe, d. h. durch Ionisierung entstehen. Das heißt, dass das Herauslösen eines Elektrons direkt in der DNA oder einem Protein oder Lipid verursacht wird. Indirekte Schäden dagegen induzieren die ROS Moleküle, die durch Wechselwirkung von Wasser mit Strahlung (Radiolyse) entstehen (siehe Abbildung 4). Diese können dann in einer sekundären Reaktion zelluläre Bestandteile schädigen (Hall and Giaccia, 2006; Williams and Fletcher, 2010). Da die Zellen bis zu 80 % aus Wasser bestehen, spielen diese indirekten Schäden eine sehr wichtige Rolle. Bei der

Bestrahlung mit Röntgenstrahlung machen die indirekten Schäden etwa 60 % bis 70 % aus (Hall and Giaccia, 2006)

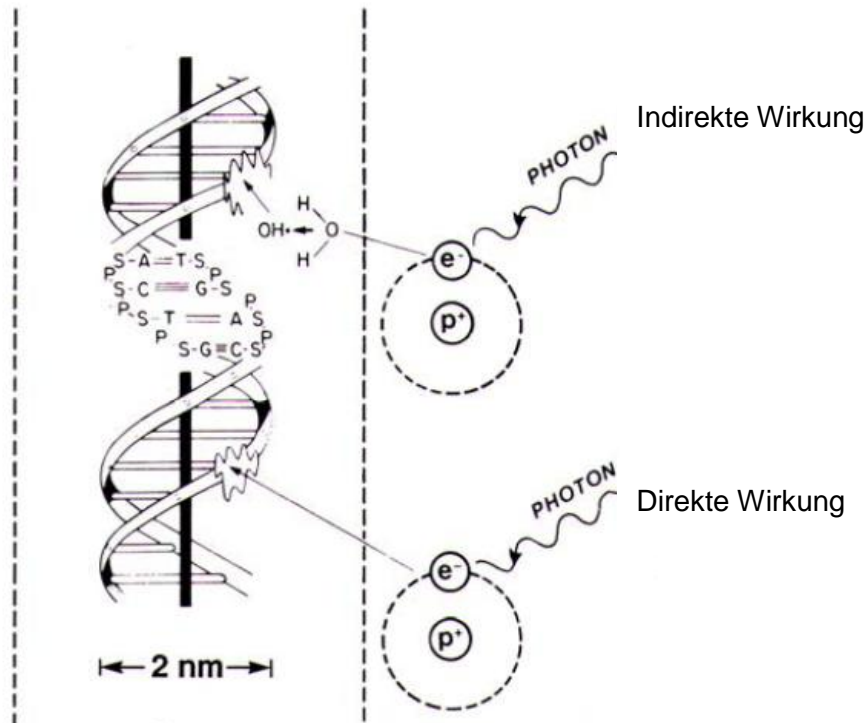


Abbildung 4: Schematische Darstellung indirekter oder direkter Wirkung der ionisierenden Strahlung auf die DNA (Hall and Giaccia, 2006).

Die kritischsten Schäden bei einer Bestrahlung von Zellen stellen die DNA Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche (DSB) dar, da diese im Falle fehlerhafte Reparatur zu Mutationen oder Deletionen genetischen Materials führen können, die wiederum zu Zellentartung und Tumorentstehung führen können (Jakob et al., 2011; Little, 2000). Aufgrund dieser Erbgut-verändernden Eigenschaften sind ionisierende Strahlen als karzinogen deklariert. Allerdings existieren Hinweise wonach auch andere strahlungsinduzierte Schäden oder Effekte (Bystander Effekt) die genetischen Mutationen induzieren können (Little, 2000). Fehlerhafte DNA-Reparatur oder irreparable DNA Schäden können außerdem zu Apoptose führen. So sind die irreparablen Schädigungen von nuklearer DNA als initiale Ereignisse bei der strahlungsinduzierten Apoptose bekannt (Prithivirajsingh et al., 2004). Die strahlungsinduzierten DNA-Schäden im Nukleus und ihre Reparatur sind im Vergleich zu Schäden an anderen zellulären Komponenten und Kompartimenten umfangreich erforscht. Bekannt ist, dass einige nicht-nukleare Signalwege, wie z.B. Ca^{2+} -Signaltransduktion, direkt nach der Bestrahlung aktiviert werden können (Leach et al., 2001).

Die Strahlungsantworten von verschiedenen Zelltypen können von vielen Faktoren abhängig sein und sich somit stark unterscheiden. Darunter zählen u.a. ihre Position im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung, unterschiedliche Reparaturfähigkeit, Toleranz gegenüber oxidativen Stress (Unterschiede in antioxidativen Systemen) und Sauerstoffgehalt.

2.3 Sauerstoff: Elixier des Lebens und Gift und seine Rolle bei der zellulären Strahlungsantwort

Als sich das Leben auf der Erde entwickelte herrschten in der Atmosphäre anaerobe Bedingungen. Davon zeugen u.a. zahlreiche anaerobe Mikroorganismen die bis heute überlebten. Diese passten sich an die heutigen atmosphärischen Bedingungen mit 21 % O₂ an, in dem sie O₂-freie Lebensräume einnahmen, oder sie entwickelten eine wirksame Abwehr gegen O₂, bzw. ROS (antioxidative Systeme). So können bei einigen anaeroben Mikroorganismen schon geringe Spuren von O₂ den Tod verursachen und bei anderen besteht eine unterschiedlich ausgeprägte Toleranz gegenüber dem O₂ (Halliwell and Cross, 1994).

Die heutigen aeroben Mikroorganismen, wie auch eukaryotische Zellen passten sich deutlich komplexer an die atmosphärische O₂ Bedingungen an und lernten den O₂ zu nutzen mit der Folge, dass sie ohne diesen nicht mehr überleben können. Sie benötigen O₂ als Elektronakzeptor bei der oxidativen Phosphorylierung, dem wichtigsten metabolischen Prozess zur ATP Gewinnung. Dennoch erfahren auch aerobe Organismen oxidativen Schäden. Ein Beispiel für die Toxizität des O₂ konnte in den frühen 1940-er Jahren, an erblindeten frühgeborenen Kindern, die in Inkubatoren mit einer hohen O₂ Konzentration lagen, beobachtet werden (Halliwell and Cross, 1994).

Bei der oxydativen Phosphorylierung findet Reduktion von O₂ zu Wasser statt, aber auch etwa 0,2 % des O₂ werden in ROS umgewandelt (Banki et al., 1999). Unter physiologischen Bedingungen stellt ROS einen Signalstoff zur Anleitung von wichtigen zellulären Prozessen dar. Eine weitere O₂-Nutzung in den Zellen entsteht durch den NADPH-Oxidase Komplex, welcher eine wichtige Komponente des Immunsystems darstellt. Dessen Funktion ist das Abtöten von Mikroben und Pilzen durch die Umwandlung von O₂ in ROS. Durch die hohe Reaktivität der ROS werden die Makromoleküle des durch Granulozyten aufgenommenen Erregers geschädigt und somit der Erreger abgetötet (Bevilacqua et al., 2012).

Zu ROS zählen z.B. Singulett-Sauerstoff (¹O₂), das Superoxidanion-Radikal (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das Alkoxyradikal (RO[•]), das Hydroxylradikal (HO[•]), das Peroxidradikal (HOO[•]), Stickstoffmonoxid (NO[•]) und Peroxynitrit (ONOO[•]). Für die Physiologie der Zelle ist es wichtig, ein Gleichgewicht zwischen ROS Produktion und

antioxydativen Systemen aufrecht zu erhalten. Die wichtigsten Komponenten des antioxydativen Systems sind Enzyme: die Katalase, die Mn-SOD (Superoxiddismutase), die Cu-/Zn-SOD und die Glutathion-Peroxidase, aber auch Vitamine und Spurenelemente (B12, B6, Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Folsäure, Eisen und Zink).

Eine zeitweilige endogen, oder auch exogen (durch äußere Einwirkungen wie z.B. ionisierende Strahlung) bewirkte Erhöhung der ROS Menge, welche nicht durch das antioxidative System neutralisiert wird, ist als Zustand des oxidativen Stresses zu bezeichnen (Andreyev et al., 2005). Dabei kann es zu oxidativen Schädigungen von Biomakromolekülen, wie DNA, Proteine und Lipide kommen (siehe Abbildung 5), die wiederum in eine Reihe pathologisch relevanten Konsequenzen münden können. So z.B. ist bekannt, dass ROS eine wichtige Rolle bei der Anleitung von intrinsischer (Park et al., 2005) und extrinsischer Apoptose, aber auch bei Nekrose (Fernandez and Perl, 2009) einnehmen kann. Eine endogene Erhöhung von der ROS Menge, insbesondere von ROS mitochondrialen Ursprungs, ist bekannt als ein wichtiger Faktor bei Alterungsprozessen und bei vielen Krankheiten, wie z.B. Alzheimer Demenz, Parkinson Demenz, Diabetes und einigen kardiovaskulären und karzinogenen Erkrankungen.

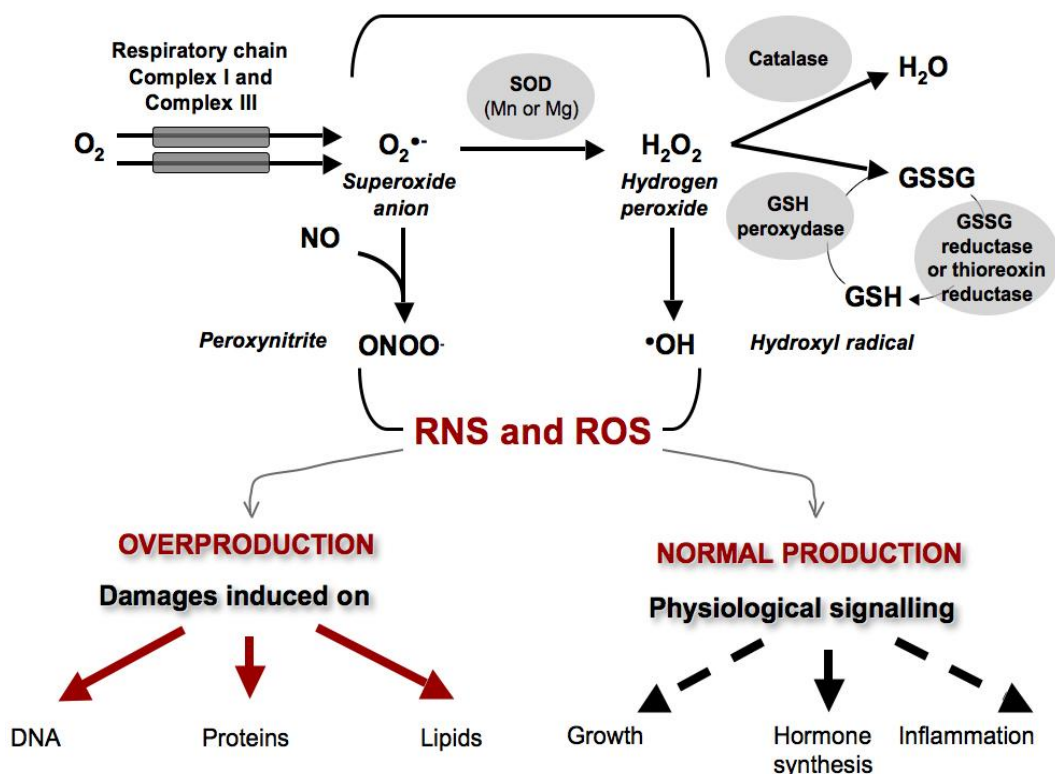


Abbildung 5: Mitochondriale ROS und RNS (engl.: *reactive nitrogen species*) spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und deren Menge wird unter physiologischen Bedingungen stets durch das antioxidative System reguliert. Kommt es zu einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen antioxidative Abwehr und ROS Produktion, so können zellulären Komponenten, wie DNA, Proteine und Lipide, beschädigt werden. (Bellance et al., 2009)

In einem Organismus ist der zelluläre Sauerstoffgehalt in einzelnen Geweben und Zellverbänden unterschiedlich. So liegt z.B. der Sauerstoffgehalt in Nierengewebe bei 9,5 %, in der Lunge bei 5,6 %, im Hirn bei 4,6 % und im Hautgewebe zwischen 1 % und 4,6 % (Hammond et al., 2014). Dieser physiologische Sauerstoffgehalt wird als „Gewebe-Normoxie“ oder „Physioxie“ bezeichnet und ist nicht mit dem Begriff „Hypoxie“ zu verwechseln. Die Hypoxie beschreibt den Zustand der Sauerstoffunterversorgung des Gewebes. Die Normoxie beschreibt die konventionelle *in vitro* Kultivierung von Zellen unter atmosphärischen (21 % O₂) Bedingungen (Hammond et al., 2014). Die Hypoxie tritt oft in soliden Tumoren u.a. aufgrund rapidem Wachstum des Tumors und ineffizienter Blutversorgung auf (Carmeliet and Jain, 2000; Hammond et al., 2014). Dabei ist nicht der gesamte Tumor hypoxisch, sondern die Bereiche, die abhängig von der Entfernung zu Blutgefäßen noch minimal notwendigen Sauerstoffgehalt für das Überleben besitzen. Die ausreichend blutversorgten Bereiche des Tumors zeichnen sich durch erhöhte Proliferationsrate aus, die von der Sauerstoffzufuhr abhängig ist.

Die Adaption von Zellen und Geweben (und Tumorgewebe) an die Hypoxie erfolgt durch die Aktivierung der Transkription von zahlreichen Genen, involviert in Prozesse die entgegen der Hypoxie wirken (wie z.B. Angiogenese) und die das Überleben in der Hypoxie sichern (u.a. anaerobe Energiegewinnung). Die meisten Hypoxie-aktivierten Gene stehen unter HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*) Kontrolle (Horowitz and Simons, 2008; Ke and Costa, 2006).

HIF-1 ist Transkriptionsfaktor und ist aufgebaut aus der O₂-reguliert exprimierten Untereinheit HIF-1 α und eine konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 β . Die O₂-abhängige Regulation der α Untereinheit erfolgt durch posttranslationalen Modifikationen wie Hydroxylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung und Phosphorylierung (Ke and Costa, 2006). Bei Anwesenheit von O₂ (siehe Abbildung 6) findet die Hydroxylierung von zwei Prolinresten durch die Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) und anschließende Ubiquitinierung durch von Hippel-Lindau (pVHL) Tumorsuppressor-Protein und E3 Ubiquitin-Ligase Komplex statt, wodurch schneller proteasomaler Abbau von HIF-1 α angeleitet wird (Radreau et al., 2009).

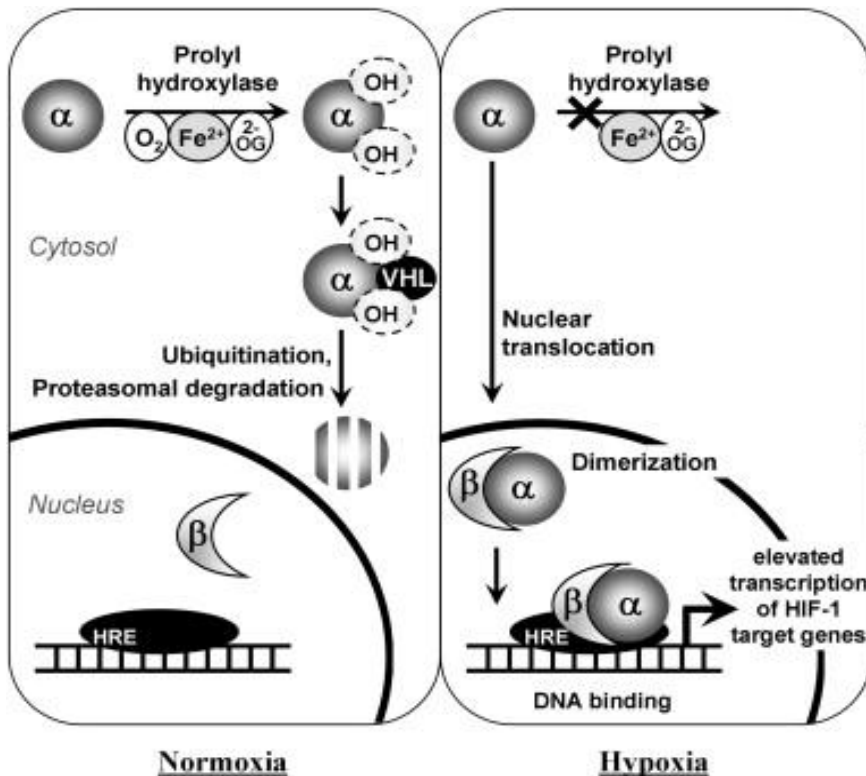


Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung vom O_2 -abhängigen Abbau von HIF-1 α . Unter hypoxischen Bedingungen findet HIF-1 Stabilisierung, durch Inaktivierung von PHDs statt gefolgt von HIF-1 induzierten Transaktivierung von Genen, die in der Adaption von Zellen an die Hypoxie involviert sind (Radreau et al., 2009)

Unter hypoxischen Bedingungen findet die Aktivierung von der α Untereinheit auf mehreren Ebenen statt. Neben den stabilisierenden Effekten (Inaktivierung von PHDs) findet eine Erhöhung der Translation und Transaktivierungsaktivität vom HIF-1 α (Yoshimura et al., 2013) statt. Neben O_2 -abhängigen (siehe Abbildung 6) sind auch einige O_2 -unabhängige regulatorische Effekte zur Modifikation der HIF-1 Aktivität und Stabilität bekannt (z. B. Interaktion mit HSP90 und RACK1, Phosphorylierung durch MAP-Kinase) (Yoshimura et al., 2013).

Die Untersuchungen im Bereich der Strahlenbiologie und Radioonkologie ergeben, dass die Zellen unter Hypoxie etwa zwei- bis dreimal strahlenresistenter sind als unter normoxischen Bedingungen. Dabei ist zelluläre Strahlungsantwort u.a. durch die oben beschriebene HIF-1-abhängige Transaktivierung von Genen gegeben. Die HIF-1 abhängige Expression von zahlreichen Genen resultiert u.a. in einer Reduzierung von strahlungsinduzierter Apoptose. Weiterhin konnte mit Hilfe von Analysen der spezifischen HIF-1-abhängigen Gene gezeigt werden, dass nach der Bestrahlung die HIF-1 Aktivität erhöhte wird, was im Falle von Tumoren mit einer schlechten Krankheitsprognose zusammenhängt (Yoshimura et al.,

2013). HIF-1 fordert somit neben der Therapieresistenz noch Tumorwachstum und Metastasenbildung (Lee et al., 2004; Yoshimura et al., 2013).

Bei der zellulären Strahlungsantwort nimmt der O_2 eine weitere wichtige Rolle ein (siehe Abbildung 7). In der Anwesenheit von O_2 findet die sogenannte Fixierung von DNA Schäden statt, wodurch diese für die Zelle irreparabel werden (Jordan and Sonveaux, 2012; Lee et al., 2004; Yoshimura et al., 2013).

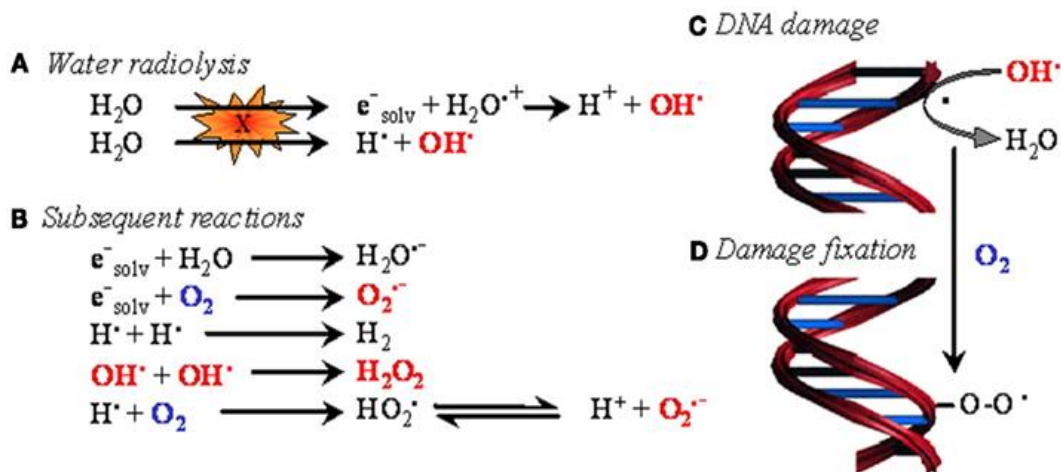


Abbildung 7: Die Fixierung von strahlungsinduzierten DNA Schäden. Bei der indirekten Wirkung von ionisierender Strahlung wird durch die Radiolyse von Wasser ROS gebildet (A). Dadurch wird eine Kettenreaktion ausgelöst, wodurch weitere ROS Moleküle gebildet werden (B). Eine der reaktivsten ROS Molekülen, OH^{\cdot} , aber auch andere ROS Moleküle können die DNA beschädigen und zur Bildung von DNA-Radikalen führen (C). Die Bildung von DNA-Radikalen stellt einen reparablen Schaden für die Zelle dar. Unter Anwesenheit von O_2 kann der Schaden fixiert werden, wodurch diese für die Zelle irreparabel wird. (Jordan and Sonveaux, 2012).

2.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der zellulären Antwort von OLN-93 Zellen auf ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy), wobei der Schwerpunkt in der Analyse von mitochondrialen Prozessen liegt. Dabei soll insbesondere der Effekt der Röntgenstrahlung auf die oxydative Phosphorylierung untersucht werden. Dazu sollen zum einen Proteom-Analysen mit Hilfe der 2D-BN/SDS Elektrophorese durchgeführt werden und somit die Unterschiede in der Proteinabundanz der einzelnen OxPhos-Komplexe und Superkomplexe in Abhängigkeit von der Bestrahlung verglichen werden. Anschließend soll die Aktivität der OxPhos-Komplexe I und IV mit Hilfe der auf der BN-Elektrophorese basierenden In-Gel Aktivitätstests untersucht werden. Zum anderen wird im Rahmen der Lipidom-Analyse der Einfluss von Strahlung auf die „Fluidität“ der mitochondrialen Membransysteme, wie auch auf ihre Lipidzusammensetzung charakterisiert. Außerdem sollen weitere zelluläre und mitochondriale Eigenschaften, wie ATP und ROS Mengen, Änderungen im mitochondrialen

elektrochemischen Potential, aber auch in metabolischen und endozytosolischen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Bestrahlung analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Bedeutung von Mitochondrien bei der zellulären Antwort auf die ionisierende Strahlung, sowohl im Hinblick auf die Schädigungen von mitochondrialen Komponenten, als auch im Hinblick auf die daraus resultierenden Reparaturmechanismen aufzeigen.

Als ein Nebenziel soll der Effekt von CoCl_2 , einem chemischen Hypoxie-Nachahmer, auf die Strahlungsantwort der OLN-93 Zellen untersucht werden. Dabei sollen die aus der Literatur bekannten Wirkungen der realen Hypoxie (Verringerung des Sauerstoffgehalts) und chemisch induzierte „nachahmende“ Hypoxie kritisch analysiert und diskutiert werden.

Unabhängig von der Strahlungseinwirkung sollen möglichst viele Proteine aus einem, für die mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen, typischen 2D-BN/SDS-Gel mittels massenspektrometrischer Methode, *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik
Bio-Imaging-System ViewPix 900	Biostep / Epson
Combitips plus 25, 10, 5 und 2,5 mL	Eppendorf
Dual Gel Caster SE 245	Hoefer
Elektronikrührer Multipoint HP6	Variomag
Electrophoresis Power Supply EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech
ELISA-Reader Infinite® M1000 PRO	Tecan Group Ltd.
Folienschweißgerät	Severin
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo
Gelelektrophorese-Apparatur SE 250 Mighty Small II	Hoefer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 260 Mighty Small II	Hoefer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 400 Ruby	Hoefer / Pharmacia Biotech
Gelelektrophorese-Apparatur SE 600 Chroma	Hoefer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 600 Ruby	Amersham Biosciences
Gelfärbeschalen	Roth
Gelgießapparatur Dual Gel Caster SE 245	Hoefer / Amersham Biosciences
Gradientenmischer 2 x 30 mL	Werkstatt FB Chemie
GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
Hebebühne DIN 12897	Bochem

Homogenisator, Glas-Teflon, 2 mL, tight-fit	Braun
Lichttisch G-2004	GEPE
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm
Magnetrührer CB161 Bibby	Scientific
Magnetrührer Combimag RCT	IKA
Magnetrührer Combimag REO	IKA
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Magnetrührer RCT basic	IKA
MALDI TOF TOF Ultraflex I	Bruker
MALDI-MS Voyager-DE Pro	Applied Biosystems
MALDI-sample plate V 700666	Applied Biosystems
Mikroskop: Wilovert TS	Hund
Monochromator 101	PTI
Multipette® plus	Eppendorf
PacAnchorChipTarget 384MTP	Eppendorf
Peristaltikpumpe Minipuls® 3	Gilson
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott
pH-Meter CG 842	Schott
Pipetten 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL	Abimed-Gilson
Pipettierhilfe: Accu-jet® pro	Brand GmbH & Co KG
Probenkammer MP-1	PTI
Röntgenröhre Isovolt DS1	Seifert
Rührwerk Eurostar digital	IKA
Scepter™	©EMD Millipore Corporation
Schüttler 3016	GFL
Schüttler HS 260 basic	IKA
Sicherheitswerkbank LaminAir® HLB 2448	Heraeus
Sicherheitswerkbank steril LaminAir® HLB 2448	Heraeus

Tischzentrifuge MicroV	Fisher Scientific
Ultraschallbad Sonorex TK 52 H	Bandelin
UV-VIS Spektralphotometer UV-2401 PC	Shimadzu
Vakuumkonzentrator Univapo 150H	UniEquip
Vakuumpumpe Unijet II	UniEquip
Vortex REAX 1DR	Heidolph
Vortex VF2	Janke & Kunkel / IKA
Waage R 200 D	Sartorius
Waage U 4100 S	Sartorius
Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore
Wasserbad 1004	GFL
Water Still Distinction D4000	Stuart
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge primoR	Heraeus
Zentrifugenrotor # 7593	Heraeus
Zentrifugenrotor F-34-6-38	Eppendorf
Zentrifugenrotor F-45-30-11	Eppendorf

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Loch-Platte, transparent	Greiner M8562
96-Loch-Platte, black, clear bottom	Greiner M0562
96-Loch-Platte, black, polypropylene	Greiner M9936
96-Loch-Platte, transparent	Greiner M3687
Einweg-Pasteurpipetten mit dünner Spitze, LDPE	Roth EA58.1
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert, LDPE	Roth EA62.1
Kapillar-Pipettenspitzen 200 RL	Biozyme 729015
Kapillar-Pipettenspitzen, MicroTips XL, 10 RL	Biozym 729025
Kapillar-Pipettenspitzen, MultiFlex Round Tips, 200 RL	Sorenson 28480

Klebefolie greiner bio-one 676070	Greiner 676070
Kryotubes	Roth L090.1
MultiScreen™ Solvinert 96-well Filtration System	Millipore MSRLN0410
OMNITIPTM FASTRACK 10 RL Reload	ULPlast 81710
Pipettenspitzen 10 RL	Biozyme 720015
Pipettenspitzen 1000 RL	Greiner 686290
Pipettenspitzen 200 RL	Greiner 739290
Pipettenspitzen Gilson®-Style1000 RL	Greiner 740290
Pipettenspitzen Standard MAKRO 1,5 mL	Roth 5846.1
PLASTIBRAND® Einmal-Küvetten, 1,5 mL, halbmikro, PMMA	BRAND 7591 15
PP-Microplatte, 96 K Greiner	Greiner 651201
PP-Röhrchen, steril,15 mL	Greiner 188 271
PP-Röhrchen, steril,50 mL	Greiner 210 270
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark 05511
Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf 0030 120.086
Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf 0030 120.094
Scepter Sensors 60 µm	Milli-Pore PHCC20060
Schutzärmel, PE	Roth L090.1
Serologische Pipetten 10 mL	Sigma SIAL1100
Serologische Pipetten 2 mL	Sigma SIAL1020
Serologische Pipetten 25 mL	Sigma SIAL1250
Serologische Pipetten 5 mL	Sigma SIAL1050
Simpak® 2 für Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore SIMPAK0D2
Zellkulturflaschen T175	Greiner C7481
Zellkulturflaschen T25	Greiner C6481
Zellkulturflaschen T75	Sigma Z707503
ZipTipC18	Millipore ZTC18M960
ZipTipC4	Millipore ZTC04S096

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDHF)	Sigma-Aldrich D6883
3 3'-Diaminobenzidin	Sigma D 5637-1G
Acetonitril, HPLC Ultra Gradient Grade	Roth T195.2
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma A3377-10G
Advanced DMEM	Gibco 12491
Alamar Blue	Molecular Probes DAL1025
Ammoniumbicarbonat	Fluka 09832
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka 9915
ATP-Kit	Abcam ab83355
Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris)	Fluka 14880
Blei(II)nitrat	Fluka 1533.4
Bromphenolblau	Fluka 18030
Cobalt-dichlorid	Sigma-Aldrich A 2212
Coomassie® Brilliant Blue G-250	Serva 35050
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Fluka 27816
Cytochrom c aus Rinderherz	Fluka 30398
Digitonin	Calbiochem 300410
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Molekularbiologie	Roth A994.2
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma S 5136
EDTA-Trypsin-Lösung (0.05% Trypsin, 0.1% EDTA)	PAN Biotech GmbH P10-027500
Essigsäure 100% p.a.	Roth 3738.5
Ethanol techn.	Chemiekalienausgabe FB Chemie
Fetal calve serum (FCS)	Sigma 12238C
Formaldehyd (37 %, wässrige Lösung)	Sigma 252549
Glycerin	Roth 3783.2

Glycin p.a.	Roth 3908
HEPES(N-2-Hydroxypiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth 9105.4
HMW Calibration Kit for Native Gelelektrophoresis	Amersham Bioscience 17-0445-01
Imidazol	Fluka 56750
Isopropanol	Chemiekalienausgabe FB Chemie
JC-1	Molecular Probes T-3168
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Fluka 60300
LMW Calibration Kit for SDS-Gelelektrophoresis	Amersham Bioscience 17-0446-01
Magnesiumsulfat	Roth P027.2
Methanol techn.	Chemiekalienausgabe FB Chemie
N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (Tricin)	Roth 6977.3
Natriumcarbonat p.a.	Roth A135.2
Natriumdihydrogenphosphat	Roth T879.1
Natriumhydroxid	Roth 6771.1
Natriumsuccinat	Sigma S 2378
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck 6516.05
Neutralrot	Molecular Probes N-3246
Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem A 1243
PBS-/- Dulbecco	Biochrom AG L 1825
Penicillin/Streptomycin (1000 U/1000 µg/mL)	Biochrom AG A 2212
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma P8340
Roti®-blue	Roth A152.1
Rotiphorese® Gel 29:1	Roth A515.1
Rotiphorese® Gel A	Roth 3037.1
Rotiphorese® Gel B	Roth 3039.1
Saccharose	Roth 4621.2
Salzsäure (suprapur)	Merck 9.975
Salzsäure p.a., 37% rauchend	Roth 2625.1

Silbernitrat	Roth 7908.2
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Roth CN30.1
Sodiumdodecylsulfat (SDS) ultra pure	Roth 2326.1
SYPRO Ruby® Staining Solution	Bio Rad 170-3138
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)	Fluka 8768.9
Trifluoressigsäure	Roth P088.1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth 5429.3
Trypsin (Porc)	Promega V5111
α -Cyano-p-hydroxyzimtsäure	Sigma C-2020
β -Mercaptoethanol	Sigma M-6250
β -NADH	Sigma N 6005-1G
ϵ -Aminocaprinsäure	Fluka 07260

3.1.3 Programme und Software

Programm/Software	Herausgeber
Delta2D 3.6 und 4.3	Decodon
Endnote X7	The Thomson Corporation
Epson-Scan	Epson
Excel 2007	Microsoft
Flex Analysis 2.2	Bruker
Image Reader LAS-3000 2.1	Fuji
MASCOT	Matrix Science
Powerpoint 2007	Microsoft
Quantity One 4.4	Bio-Rad
UVProbe 1.11	Shimadzu
Word 2007	Microsoft

3.1.4 Darstellung der Daten und Statistik

Die Daten der Proteom-Analyse (Analyse der relativen Proteinmenge und der relativen Aktivitäten der OxPhos-Komplexe I und IV) wurden aufgrund starker Abweichungen zwischen unterschiedlichen Experimentdurchführungen (n=3) als einzelne Werte dargestellt. Durch die Bildung von Mittelwerten aus diesen Daten wären viele tendenzielle Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben nicht erkennbar, weshalb die Darstellung der einzelnen Werte gewählt wurden.

Bei allen übrigen Diagrammen in dieser Arbeit geben die Fehlerbalken die Standardabweichung des Mittelwertes wieder. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden stets mithilfe der Excel-Funktionen „STABW“ bzw. „MITTELWERT“ errechnet.

Der Signifikanztest wurde in dieser Arbeit ausschließlich bei Proben durchgeführt, bei denen die Anzahl der Replikate größer/gleich 6 war. Dabei wurde „t-Test“ angewendet. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mithilfe der Excel-Funktion „TTEST“, wobei ungepaartes (unabhängig von der Anzahl der Varianzen), zweiseitiges (Berücksichtigung beider Endflächen der Gauß-Verteilung) Modul des Tests zur Anwendung kam. Das Ergebnis des Signifikanztests ist der p-Wert und gibt die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Korrelation der vergleichenden Werte wieder (Bender et al., 2007). Gewöhnlich wird Signifikanz nach p-Wert in drei Stufen wie folgt unterteilt:

p-Wert $\leq 0,05$ (die Wahrscheinlichkeit für zufällige Korrelation liegt unter 5 %, signifikant, gekennzeichnet im Diagramm mit *);

p-Wert $\leq 0,01$ (die Wahrscheinlichkeit für zufällige Korrelation liegt unter 1 %, hoch signifikant, gekennzeichnet im Diagramm mit **)

p-Wert $\leq 0,001$ (die Wahrscheinlichkeit für zufällige Korrelation liegt unter 0,1 %, höchst signifikant, gekennzeichnet im Diagramm mit ***) (Bortz, 2013).

3.1.5 Zelllinie

Die permanente OLN-93 Zelllinie ist 1996 von C. Richter-Landsberg und M. Heinrich etabliert worden. Die Primärkultur wurde dabei von Zellen aus Hirngewebe von einen Tag alten *Wistar*-Ratten präpariert. Bei der permanenten Zelllinie OLN-93 handelt es sich um spontan transformierte Zellen, welche die Eigenschaften von fünf bis zehn Tage alten Oligodendrozyten aufweisen (Richter-Landsberg and Heinrich, 1996). Oligodendrozyten produzieren Myelin, welches für das zentrale Nervensystem von essentieller Bedeutung ist. Myelin umgibt die Axone der Nervenzellen spiralförmig und isoliert sie elektrisch.

3.2 Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Methoden werden in dieser Arbeit kurz aufgeführt und vorgestellt. Die detaillierte Theorie und die Prozedur über die zellbiologischen Methoden können in den Masterarbeiten von Frau Meral Azakli. (Azakli, 2013) und Frau Christine Kern (Kern, 2013a) welche unter meiner Betreuung durchgeführt wurden, nachgelesen werden.

3.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Um eingefrorene Zelllinien aufzutauen, wurde das jeweilige Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Noch bevor die Zellen komplett aufgetaut waren, wurden sie in PBS aufgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Dieses wurde mit PBS aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (RT, 300 g, 5 min). Dieser Waschschrift war notwendig, um das zum Einfrieren benötigte DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen in frischem und vorgewärmtem Medium (DMEM Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen überführt.

Zum Einfrieren von Zellen wurden 5×10^6 Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in einem Medium-Endvolumen von 1 ml aufgenommen. Diesem war zuvor 10% DMSO hinzugefügt worden, welches die Kristallbildung beim Einfrierungsprozess verminderte. Dieser wurde aus gleichem Grund sehr langsam vollzogen. Die Zellen wurden dafür in Kryoröhrchen überführt und zunächst für 1 Stunde bei -20°C inkubiert, bevor sie bei -80°C gelagert wurden. Nach ca. 2 Tagen wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte mit dem Zellzähler Scepter™ von der Firma Millipore. Hierfür wurde Zellsuspension mit PBS verdünnt. Das Gerät misst mit hoher Genauigkeit eine Zellzahl zwischen 5×10^4 und 5×10^5 Zellen pro mL (Introducing Scepter™ 2.0 Cell Counter; Millipore 2011). Anschließend wurde der Verdünnungsfaktor herausgerechnet.

3.2.3 Kultivierung von Zellen

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die Zellen wurden bei Standardbedingungen (37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂) als Monolayer-Kulturen in Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Zellen erhielten ein Komplettmedium bestehend aus dem

DMEM Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS), 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S). Subkultivierung der Zellen erfolgte dabei in regelmäßigen Abständen von 3 bis 4 Tagen. Hierzu wurden das verbrauchte Medium dekantiert und die adhären Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit der Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C. Das Ablösen der Zellen wurde unter mikroskopischer Beobachtung kontrolliert. Durch Zugabe von Medium mit Serum wurde nach dem Ablösen der Zellen das Trypsin durch Serumbestandteile inaktiviert. Mit einer 10 ml Pipette wurden durch Auf- und Abpipettieren noch bestehende Zellaggregate vereinzelt. Standardmäßig erfolgte die Neu-Aussaat in 75 cm² Zellkulturflaschen (T75) durch die 1 zu 9 Verdünnungen der Zellsuspension.

3.2.4 Kultivierung von Zellen unter Hypoxie nachahmenden Bedingungen

Der Einfluss von Hypoxie-nachahmender Bedingung auf die Effekte der ionisierenden Strahlung auf die Zellen wurde mit Hilfe von CoCl₂ (Ardyanto et al., 2006; Goldberg et al., 1988; Lee et al., 2013) untersucht. Hierfür wurde erst ein Vorexperiment durchgeführt, um die nicht toxische CoCl₂-Konzentration zu bestimmen. Es wurden CoCl₂-Konzentrationen von 50, 150, 300, 500, und 1000 µM getestet. Die Bestimmung von geeigneter CoCl₂ Konzentration erfolgte rein subjektiv am Mikroskop. Die Zellen, die im Medium mit CoCl₂ Konzentration größer 300 µM kultiviert wurden, fingen an, sich mit der Zeit vom Flaschenboden abzulösen. Zellen, die im Medium mit 300 µM CoCl₂ wuchsen, zeigten keine visuellen Unterschiede verglichen mit den Zellen, welche im CoCl₂-freien Medium kultiviert wurden. Diese Konzentration wurde auch in den Experimenten in der Publikation von Lee et al. (Lee et al., 2013) angesetzt. Aus diesen Gründen wurde eine Konzentration von 300 µM CoCl₂ für die Experimente genutzt.

Die Zellen wurden für 48 Stunden in CoCl₂-haltigem Medium kultiviert, um sie an die Bedingungen anzupassen, bevor sie bestrahlt oder / und analysiert wurden.

3.2.5 Bestrahlung von Zellen

Etwa 24 Stunden bevor die Zellen in der Zellkulturflasche Konfluenz erreichten, wurden diese mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte an der X-ray Röhre Isovolt DS1 mit einer Wolfram-Anode (Arbeitsgruppe Prof. Löbrich, TU-Darmstadt). Die Bestrahlungsenergie-dosis von 8 Gy wurde bei allen Experimenten gewählt.

3.2.6 Ernte der Zellen

Die Zellernte für alle Experimente wurde nach folgender Prozedur durchgeführt: Von konfluent angewachsenen Zellen wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgten die Benetzung von Zellen mit der Trypsin/EDTA-Lösung und eine 5-minütige Inkubation bei 37°C, wodurch die Zellen vom Zellkulturgefäß abgelöst wurden. Das Ablösen der Zellen wurde unter mikroskopischer Beobachtung kontrolliert. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben gezählt. Ab diesem Arbeitsschritt wurden die Zellen, im Fall, dass diese für die Proteomanalyse bestimmt waren, stets auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen pelletiert durch Zentrifugation (4°C, 700 g, 5 Min). Bei Experimenten zur Untersuchung der physiologischen Eigenschaften der Zellen wurde die Zellernte bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden direkt für die Experimente angesetzt.

3.3 Protein-Analytische Methoden

Detaillierte Beschreibungen zu den Protein-Biochemischen Methoden sind der Masterarbeit von Frau Christine Kern (Kern, 2013a) zu entnehmen. Im Folgenden werden diese kurz vorgestellt.

3.3.1 Isolierung von Mitochondrien

Um sicherzustellen, dass die Mitochondrien in ihrem aktiven Zustand isoliert werden, ist es wichtig, dass alle Lösungen, Gefäße und Zellen während der gesamte Arbeitsprozedur auf Eis gelagert werden. Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte direkt nach Ernte der Zellen (Abschnitt 3.2.6). Pelletierte Zellen wurden in Homogenisierungspuffer, welcher mit 0,5 % PIC (Protease-Inhibitor-Cocktail) versetzt wurde, resuspendiert und mit Hilfe des *tight-fit*-Homogenisators durch Scherkräfte aufgeschlossen (pro 2 ml der Zellsuspension, 800 rpm, 10 Hübe).

Homogenisierungspuffer	
HEPES/ NaOH pH 7,4	10 mM
Na ⁺ /EDTA	1,1 mM
in MilliQ H ₂ O, gelagert bei -20°C, steriltriftriert (0,2 µm-Filter)	

Zu dem Homogenisat wurde anschließend Saccharose in einer Endkonzentration von 0,25 M gegeben, um die Mitochondrien vor einem osmotischen Schock zu schützen. Das gesammelte Homogenisat wurde anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 1700 g zentrifugiert. Weiter wurde der Überstand gesammelt und das Pellet erneut in der Homogenisierungspuffer (0,5% PIC, 0,25 M Saccharose) resuspendiert, sowie erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Um Mitochondrien von restlichen Zellbestandteilen und Zelltrümmern zu trennen, wurde der gewonnene Überstand für 10 Minuten bei 4°C und 13700 g zentrifugiert. Mitochondrien befanden sich in dem Sediment. Das Sediment wurde abhängig von der Größe in 800 µL bis 1200 µL Homogenisierungspuffer (0,5% PIC, 0,25 M Succrose) aufgenommen. Isolierte Mitochondrien wurden in 200 µL große Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff schock-eingefroren. Die Lagerung der Mitochondrien fand bei -80°C statt.

Für die Proteinanalysen in der Abhängigkeit der Behandlung von Zellen mit Röntgenstrahlung (Analyse der Proteinmenge und In-Gel Aktivitätstests) wurden von bestrahlten und von unbestrahlten (Kontrolle) Zellen pro Experimentansatz jeweils Zellen aus 9 Zellkulturgefäßen mit je einer Wachstumsfläche von 75 cm² (T75) geerntet.

3.3.2 Ermittlung der Proteinkonzentration mittels Roti® Nanoquant

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Roti® Nanoquant basiert auf der kolorimetrischen Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (Bradford, 1976). Das Prinzip der Methode beruht auf der Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 hauptsächlich an hydrophoben und kationischen Seitenketten der Aminosäuren. Aufgrund dieser Anlagerung erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Diese Absorptionszunahme bei 595 nm ist proportional zur Proteinmenge in der Lösung.

Pro Probe wurden 5 Verdünnungen von der Mitochondrienlösung eingesetzt und in Triplikaten gemessen. Des Weiteren wurde eine BSA-Verdünnungsreihe angesetzt, mit Hilfe derer eine Standardgerade erstellt wurde. Die Standardgerade wurde als der Absorptionen-Verhältnis (465 nm / 595 nm) gegen die Konzentration gebildet (Zor and Selinger, 1996). Anhand der gemessenen Absorptionen der Proben kann mithilfe der Geradengleichung und des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentration errechnet werden.

3.3.3 Solubilisierung von mitochondrialen Proteinen

Zur Analyse von Membranproteinen müssen diese zunächst mit Detergenzien aus der Lipiddoppelschicht herausgelöst und in eine wässrige Lösung gebracht werden. Zur Solubilisierung wurde das Detergens Digitonin verwendet. Hierbei handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergens, welches die Proteine unter sehr milden Bedingungen aus den Membranen herauslöst, so dass sowohl die nativen Formen, als auch Protein-Protein-Interaktionen erhalten bleiben (Krause and Seelert, 2008). Das Detergens-zu-Protein-Verhältnis ist beim Vorgang der Solubilisierung ein sehr wichtiger Parameter. Das Verhältnis von Digitonin zu mitochondrialen Proteinen aus OLN-93 Proben war 8 zu 1 (w/w). Alle Arbeitsschritte der Solubilisierung der Membranproteine wurden auf Eis ausgeführt. Zuerst wurde ein Austausch der Puffer in den mitochondrialen Proben durchgeführt. Dafür wurden die Proben mit Solubilisierungspuffer versetzt und kurz homogenisiert. Anschließend wurde für 8 Minuten bei 4°C und 20.800 g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in den Solubilisierungspuffer aufgenommen.

Solubilisierungspuffer

HEPES/NaOH pH 7,4	33,33 mM
Kaliumacetat	166,67 mM
Glycin (w/v)	11,11 %
in MilliQ H ₂ O, sterilfiltriert (0,2 µm-Filter)	

Für die Solubilisierung wurde die entsprechende Menge der 10% Digitonin-Lösung zu den Proben (8 g / 1 g) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben in Abständen von 10 Minuten am Vortex durchgemischt. Anschließend fand eine Zentrifugation der Proben für 10 Minuten bei 20800 g und 4°C statt. Der Überstand enthält neben Lipiden und Detergensmolekülen, die solubilisierten Proteine und wird restlos abgenommen und in ein frisches, vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe kann nun auf ein blau-natives Gel aufgetragen werden.

3.3.4 Blau-native Elektrophorese

Die blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) ermöglicht eine native Auftrennung von Proteinen und supramolekularen Organisationen von Proteinen (Schagger and von Jagow, 1991), wie zum Beispiel von Superkomplexen der Atmungskette. Wichtig ist bei der BN-PAGE die Verwendung eines Kathodenpuffers mit Coomassie Blue G-250

Farbstoff. Durch die negative Ladung des Farbstoffes, der an die Proteine gebunden ist, wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode (Krause, 2006).

Einzelheiten zu dieser Methode sind der Masterarbeit von Frau Christine Kern zu entnehmen (Kern, 2013a).

3.3.4.1 Blau-native Gele

Für die In-Gel Aktivitätsmessungen und für die Experimente für quantitative Analyse der Proteinmenge wurden stets BN-Gele der mittleren Größe (10,5 x 10 x 0,15 cm³, H x B x D) verwendet. Die Auftrennung der Proteine für die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine erfolgte mithilfe der großen (16 x 18 x 0,15 cm³, H x B x D) BN-Gele. Alle BN-Gele sind diskontinuierliche Gradientengele mit einer Totalacrylamidkonzentration von 3 % bis 13 % im Trenngel und 3 % im Sammelgel. Der Vernetzungsgrad beträgt jeweils 3 %. Genaue Angaben zur Gelen-Herstellung sind der Masterarbeit von der Frau Christine Kern zu entnehmen (Kern, 2013a).

3.3.4.2 Auftragung von Proben und Durchführung der Elektrophorese

Die solubilisierten mitochondrialen Proteine wurden in BN-Geltaschen aufgetragen. Für die Auftrennung von Proteinen zur anschließenden massenspektrometrischen Identifizierung, wurde 400 µg der Proteine pro Tasche aufgefüllt. Für alle anderen Experimente wurde die Proteinmenge aus 1,5 x 10⁶ Zellen pro Geltasche aufgetragen. Außerdem wurden auf jedem Gel eine Tasche mit *HMW*-Marker und eine Tasche mit solubilisierten Proteinen (3 g Digitonin / 1 g Protein) aus BHM (*bovine heart mitochondria*) gefüllt. Der *HMW*-Marker dient als Größenstandard und die BHM-Probe ist eine gut untersuchte Referenzprobe, die in der Arbeitsgruppe Dencher isoliert und eingesetzt wurde. BHM Probe stellte einer Hilfestellung bei Zuordnung der Proteinbanden.

Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 15 mA (bei zwei Gelen 30 mA) gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 250 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet als die Lauffront das Reservoir des Anodenpuffers erreichte. Die Probe wurde vor der Auftragung stets auf Eis gelagert und die anschließende Gelelektrophorese fand bei 4°C statt.

Die genauere Angaben, wie auch Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer, sind in der Arbeit der Frau Christine Kern aufgeführt (Kern, 2013a).

3.3.5 Coomassie Blue Färbung der Gele

Die Färbung der Proteine in den Gelen nach Auftrennung mithilfe BN-PAGE erfolgte mit RotiBlue®-Färbelösung. Diese Färbelösung beinhaltet den Farbstoff Coomassie Blue G-250 und sie ermöglicht eine Proteindetektion unter 30 ng Protein pro Bande. Außerdem ist bei dieser Methode eine geringe Hintergrundfärbung gegeben. Die Gele wurden über Nacht in der RotiBlue®-Färbelösung inkubiert und anschließend in einer Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar und der Hintergrund entfärbt wurden.

3.3.6 In-Gel Aktivitätstests

In-Gel Aktivitätstests ermöglichen zum einem die Zuordnung der Proteinbanden in den BN-Gelen und zum anderen weisen sie den Erhalt der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Proteine nach der BN-PAGE nach. In der Arbeitsgruppe Dencher wurden bereits die In-Gel Aktivitätstests für alle Atmungskettenkomplexe aus Mitochondrien etabliert. Die Aktivitätstests basieren auf der Arbeit von Wittig et al. aus dem Jahr 2007 (Wittig et al., 2007) und sie wurden im Lauf der Jahre in der Arbeitsgruppe Dencher modifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden In-Gel Aktivitätstests für die Komplexe I und IV der Atmungskette durchgeführt.

3.3.6.1 Komplex I

In-Gel Aktivitätstest für Komplex I der Atmungskette funktioniert, indem die BN-Gele in eine für Komplex I spezifische Lösung gelegt werden. In der Lösung befindet sich Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid (NBT), welches als Elektronakzeptor bei der NADH-Oxidation durch NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase fungiert und dabei zu violetterem Formazan reduziert wird. Die Bildung von Formazan resultiert als sichtbares Präzipitat, welches densitometrisch in Abhängigkeit von der Zeit dokumentiert wurde. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Scanners in Zeitabständen von 10 Minuten.

In-Gel Aktivitätstest-Lösung für Komplex I

Tris/HCl (pH 7,4)	100 mM
Glycin	768 mM
NBT	0,489 mM
β-NADH	0,1 mM
In MilliQ H ₂ O	

3.3.6.2 Komplex IV

In-Gel Aktivitätstest für Komplex IV der Atmungskette basiert auf der Oxidation von Cytochrom-c. Die Reaktion wird durch die Cytochrom c Oxydase Aktivität des Komplexes IV katalysiert (Schafer et al., 2006). In der Lösung für Komplex IV Aktivität befindet sich neben Cytochrom-c auch 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Das oxidierte Cytochrom-c oxidiert DAB, wodurch bräunliches Präzipitat gebildet wird. Die BN-Gele werden analog zum In-Gel Aktivitätstest für Komplex I in entsprechender Lösung inkubiert und zeitabhängig densitometrisch dokumentiert.

In-Gel Aktivitätstest-Lösung für Komplex IV

Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O	50 mM
3,3' Diaminobenzidin (DAB)	1,58 mM
Cytochrome c (<i>bovine</i>)	0,05 mM
in MilliQ H ₂ O	

3.3.6.3 Densitometrische Auswertung der Aktivität

Die In-Gel Aktivitätstests wurden mithilfe der Software Delta2D ausgewertet. Hierfür wurden die aufgenommenen Gel-Scans als Graustufen-TIFF-s aufgenommen und in das Programm geladen. Anschließend wurde die zeitabhängige Zunahme der Grauwerte jeder einzelnen Probe analysiert. Die Auswertung der Grauwerte erfolgte zum einen für die Komplexe in ihre individuelle Form und zum anderen für die Superkomplexe ohne dabei zwischen einzelnen Superkomplexen zu unterscheiden. Eine Normierung der erhaltenden enzymatischen

Aktivitäten war nicht erforderlich, da bei der Analyse jeweils die Proteinmenge aus $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Geltasche aufgetragen wurde. Somit wurde im Rahmen meiner Arbeit die relative Aktivität der Komplexe in einer bestimmten Zellenzahl analysiert.

3.3.7 2D BN/SDS Elektrophorese

Die zweidimensionale Blau-Native / Natriumdodecylsulfat-PAGE (2D-BN/SDSPAGE) ist die Methode der Wahl für die Analyse der Untereinheiten der Proteinkomplexe (Reifschneider et al., 2006; Schlegel et al., 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die 2D-BN/SDS-PAGE durchgeführt, um Proteine und Proteinkomplexe zu separieren, zum einen für die anschließende massenspektrometrische Identifizierung und zum anderen für die quantitative Analyse der Proteinmenge.

Die Proteinkomplexe und Superkomplexe wurden zunächst über BN-PAGE (1. Dimension) nativ aufgetrennt und anschließend über SDS-PAGE (2. Dimension) in ihre Untereinheiten separiert. Detaillierte Anleitung zur Herstellung von Gelen ist in der Masterarbeit von der Frau Christine Kern (Kern, 2013a) beschrieben. Der praktische Teil der Experimente wurden im Rahmen der Betreuung ihrer Masterarbeit durchgeführt.

3.3.7.1 2D-Gele und Auftragung von Proben

Die erste Dimension (BN-PAGE) wurde, wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde die Spur der zu untersuchenden Probe ausgeschnitten und mit dem Denaturierungspuffer eine Stunde inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurde die BN-Gel-Spur in 2D Gelmatrix (SDS-Gel) eingebaut. Beim Gel-Gießen wurde eine Auftragstasche für *LMW*-Marker hergestellt. Der *LMW*-Marker dient als Molekularmassenstandard. Die zu analysierende Probe befand sich in der eingebauten BN-Gel-Spur. Die Elektrophorese wurde gewöhnlich über Nacht mit einer Spannung von 43 V und einer Stromstärke von 160 mA durchgeführt. Beendet wurde die Elektrophorese nach Einlauf der Lauffront in die Pufferlösung.

3.3.8 SYPRO Ruby Färbung von Gelen

SYPRO Ruby ist ein kommerzieller Fluoreszenzfarbstoff, der Proteine durch Bindung an basische Aminosäuren und das Polypeptid-Rückgrat anfärbt. Ein wesentlicher Vorteil dieser Färbemethode gegenüber einer gewöhnlichen Coomassie-Blue oder Silberfärbung ist der

äußerst hohe dynamische Bereich bei der Anfärbung der Proteine. Dieser Bereich erstreckt sich über drei bis vier Größenordnungen. Gleichzeitig ist er mit einer Nachweisgrenze von 1 bis 2 ng pro Proteinbande oder Spot (Berggren et al., 2000) ähnlich sensitiv wie eine Silberfärbung (Patton, 2000).

3.3.9 Auswertung von 2D Gelen

Die Auswertung von SYPRO Ruby® gefärbten 2D-BN/SDS Gelen erfolgte mit Hilfe Delta2D Software. Dabei wurden speziell durch die Software definierten Proteinspots in unterschiedlichen Proben (Gelen) quantitativ verglichen. Für die relative Quantifizierung der Proteinspots wurde die einzelne Spotfärbeintensität aus einem Gelbild nicht als absoluter Grauwert, sondern prozentual vom Gesamtgrauwert des Gels und somit anteilig an der Gesamtheit aller Spots angegeben. Der Gesamtgrauwert eines Gels (Gesamtheit aller Spots eines Gels) wurde ebenfalls mit Hilfe der Software durch heraus löschen von Gelrändern, Markerbanden und Farbreisten definiert. Weiterhin war wichtig sicher zu stellen, dass alle Spots die zu Gesamtgrauwert beitragen, in allen zu untersuchenden Proben (Gelen) detektierbar waren und, dass ihre Intensitäten (Grauwerte) innerhalb des linearen Bereichs des Farbstoffs, sowie des CCD-Kamerasystems lagen. Eine zusätzliche Nominierung der Werte war nicht erforderlich, da sich bei den zu untersuchenden Proben (Gelen) immer um solubilisierten mitochondrialen Proteine aus je $1,5 \times 10^6$ Zellen handelte. Die relative Quantifizierung der einzelnen Proteinspots stellte somit die relative Proteinmenge in einer bestimmten Zellzahl dar.

3.3.10 Silber-Färbung von Gelen

Die sehr sensitive Silberfärbung ermöglicht eine Anfärbung von Proteinen mit geringen Proteinkonzentrationen. Diese Methode bietet gegenüber einer Coomassie Blue Färbung zwar den Vorteil einer etwa um den Faktor 10 höheren Sensitivität, weist jedoch auch einige Nachteile hinsichtlich der Quantifizierbarkeit der Proteinspots auf. Die Silberfärbung wurde nach Blum et al. durchgeführt (Blum, 1987). Die ausführliche Durchführung und die Lösungen sind in der Masterarbeit von der Frau Christine Kern (Kern, 2013a) beschrieben.

3.3.11 Identifizierung der Proteine mit Hilfe der 2D Elektrophorese und PMF Massenspektroskopie

Die massenspektrometrische Methode *Peptide Mass Fingerprintings* (PMF) wurde eingesetzt, um die extrahierten Proteine aus 2D-Gelen zu identifizieren. Dazu werden die entsprechenden Spots ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe einer

Protease, meist Trypsin, verdaut. Anschließend wird das Verdauungsmuster der entstandenen Peptide massenspektrometrisch analysiert. Messdaten können anschließend mit Hilfe der entsprechenden Software und den; in der Datenbank befindlichen Referenzen verglichen werden, um die Proteine zu identifizieren.

Probenaufarbeitung, -auftrennung, Spotsausschneidung und Proteinverdau wurden von mir durchgeführt. Die Messungen erfolgten am Bruker MALDI TOF TOF Ultraflex I Massenspektrometer am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie in Düsseldorf. Die Durchführung der Messungen und Auswertung übernahmen die Mitarbeiter von Dr. Stefan Lehr, Dr. Sonja Hartwig und Waltraud Passlack sowie Frau Dipl.-Chem. Manuela Kratochwil und Herr Dipl.-Chem. Sven Marx aus der Arbeitsgruppe Dencher.

3.4 Lipid-Analytische Methoden

Die Lipid-Analytische Methoden wurden von Frau Stefanie Kern in Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Die massenspektrometrische Messungen entstanden durch die Zusammenarbeit der Frau Stefanie Kern und Frau Christine Kern. Alle Einzelheiten zur Theorie und zur Prozedur Lipid-analytischer Methoden können in den ihren Masterarbeiten (Kern, 2013a; Kern, 2013b), sowie in der Dissertation von Michael Muschol (Muschol, 2014) nachgelesen werden. In folgenden Abschnitten werden diese nur kurz erläutert.

3.4.1 Fluoreszenz-Anisotropie

Die „steady state“ Fluoreszenz-Anisotropie Methode wurde angewendet, um die Membranfluidität zu analysieren. Die bestimmten Fluoreszenzsonden wurden in der Membran einlagert. Nach der Anregung der Sonden mit linear polarisiertem Licht, wurde die Polarisation des emittierten Lichts gemessen. Die Anisotropie wurde aus Polarisation berechnet. Sowohl Anisotropie, als auch Polarisation beschreiben die Richtungsabhängigkeit der Emission und beide sind gegenüber der Beweglichkeit der Moleküle in der Membran, bzw. der Fluidität der Membran umgekehrt proportional (Lentz, 1993).

Für die Analysen der mitochondrialen Membranen wurde die Fluoreszenzsonde DPH verwendet. Diese lagert sich in die lipophileren, inneren Bereiche der Membran (Shinitzky and Barenholz, 1978). Bei der Analyse der Fluidität von Zellmembran wurden sowohl DPH, als auch TMA-DPH Fluoreszenzsonden angewendet. TMA-DPH Sonde lagert sich an äußere hydrophilere Membranbereiche, nahe Phospholipidkopfgruppen (Prendergast et al., 1981).

Die Durchführung der Messungen wurde von Frau Stefanie Kern übernommen. Alle Einzelheiten zu dieser Methode, über die Theorie, Durchführung und angewandten Lösungen, sind in der Masterarbeit von Frau Stefanie Kern aufgeführt (Kern, 2013b).

3.4.2 Qualitative Lipidanalyse mit Hilfe MALDI TOF MS

Die Messungen wurden am MALDI-TOF Massenspektrometer Voyager der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Gerät ist ausgestattet mit gepulsten 337 nm Stickstofflasern und mit Beschleunigungsspannung von 20 kV. Für die Messung wurde die Probe mit einer Standard- und Matrixlösung auf die Probenplatte aufgetragen (siehe (Kern, 2013b)). Als Matrix wurde 9-Aminoacridin (9-AA) verwendet. Dabei wurde Matrix in einem starkem Überschuss, verglichen zur Probe aufgetragen. Auf diese Weise wird die Probe vor Zersetzung durch Laserstrahl geschützt. 9-AA absorbiert die Laserenergie, wodurch es elektronisch angeregt wird und somit die Energie, die für das Ablösen (Desorption) und die Ionisierung von den Probe-Molekülen aus Matrixkristallen notwendig ist, zur Verfügung stellt. Desorbierte Proben-Moleküle bewegen sich in dem Vakuum zum Detektor. Alle Spektren werden in negativem Reflektormodus mit der verzögerten gepulsten Extraktion mit einer Verzögerungszeit von 100 ns erworben. Für jede Probe wurden 10 technische Replikate gemessen.

Die isolierten Mitochondrien wurden vor der Auftragung auf die Probenplatte umgepuffert. Dafür werden die Mitochondrien bei 14000 g und 4 ° C für 8 min zentrifugiert. Der Pellet wurde in MilliQ -H₂O resuspendiert, so dass die Konzentration von 0,5 µg/µL erhalten wurde.

Die Messungen wurden von Frau Stefanie Kern und Frau Christine Kern durchgeführt. Alle Einzelheiten zur Durchführung, wie auch ausführliche theoretische Hintergründe können in ihren Masterarbeiten nachgelesen werden (Kern, 2013a; Kern, 2013b), aber auch in der Dissertation vom Herrn Michal Muschol, der die Methode in unserem Labor etablierte (Muschol, 2014)

3.5 Methoden zur Analyse der zellulären und mitochondrialen Aktivitäten

In den folgenden Abschnitten werden ausgewählte Methoden zur Untersuchung von zellulären und mitochondrialen Aktivitäten kurz beschrieben. Detaillierten Beschreibungen sind in den Arbeiten von Frau Meral Azakli (Azakli, 2013) und Frau Christine Kern (Kern, 2013a) aufgeführt.

3.5.1 ATP-Bestimmung

Die Bestimmung der ATP-Konzentration in den Zellen erfolgte mittels des ATP Assay Kit von *abcam*®, nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden Zellen lysiert in dem ATP assay Puffer und für 2 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in die 96-Lochplatte überführt. Anschließend erfolgten die Addition von 50 µL des Reaktions-Mixes zu jeder Kavität und eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Die Anregungswellenlänge beträgt 535 nm und die Emissionswellenlänge 587 nm. Die Messungen erfolgten am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd.

Die Quantifizierung von ATP wurde durch das gleichzeitige Vermessen einer ATP-Standardreihe mit bekannter ATP-Konzentration und der Probe erzielt. Mithilfe der Kalibrierungsgerade der Standardreihe und der gemessenen Fluoreszenzintensität der Probe kann die ATP-Konzentration berechnet werden. (Chen et al., 2011; Mayeur et al., 2013). Die genauere Beschreibung der Durchführung ist in den Masterarbeiten von Frau Christine Kern (Kern, 2013a) und Frau Meral Azakli (Azakli, 2013), die unter meiner Betreuung entstanden, dargestellt.

3.5.2 ROS-Detektion

Das 2'-7'-dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) wurde zur Detektion von ROS eingesetzt. DCFH-DA passiert freiwillig die Zellmembran und wird nach Aufnahme in die Zelle durch Esterasen in 2'-7'-dichlorofluorescein (DCFH) umgewandelt. Tritt anschließend eine Reaktion zwischen ROS und DCFH auf, so geht DCFH in das fluoreszierende Molekül 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) über (Dikalov et al., 2007). DCFH-DA wird als ein genereller Indikator für ROS akzeptiert. Es reagiert mit H_2O_2 , NO_3^- , Lipidhydroperoxiden und in einem geringeren Ausmaß mit $\bullet O_2$ (Dikalov et al., 2007).

Die Experimente wurden nach Lee *et al.* modifiziert und durchgeführt (Lee et al., 2013). Hierfür wurden die Zellen in schwarzen 96-Lochplatten ausgesät. Am Tag der Messung wurden die Zellen für 40 Minuten in DCFH-DA-haltigem Medium (serumfrei) inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurde zu den Zellen PBS zugegeben und die Proben am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd. vermessen (ex./em., 488 nm/530 nm). Die Messungen erfolgten im Rahmen der Zusammenarbeit mit Frau Christine Kern. Alle weitere detaillierte Informationen können in ihrer Masterarbeit nachgelesen werden (Kern, 2013a).

3.5.3 Messungen von mitochondrialem Membranpotential

Die Messungen von mitochondrialem Membranpotential wurden mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) durchgeführt. JC-1 ist eine kationische und lipophile Substanz, welche zellmembranpermeabel ist. Nach Eintritt des Farbstoffs in die Zelle wandert er in die „gesunden“ Mitochondrien mit stabil hohem Membranpotential, wo er sogenannte J-Aggregate bildet. Die JC-1 Monomere in dem Zytoplasma emittieren grüne Fluoreszenz (535 nm). Mit Bildung der J-Aggregate in den Mitochondrien verschiebt sich das Emissionsspektrum des Farbstoffs von Grün zu Rot (590 nm). Eine Depolarisation der mitochondrialen Membran ist somit durch eine Abnahme der Rot- zu Grün-Fluoreszenz erkennbar.

Die Experimente wurden nach Lee *et al.* modifiziert und durchgeführt (Lee et al., 2013). Hierfür wurden die Zellen in schwarzen 96-Lochplatten ausgesät. Am Tag der Messung wurden die Zellen für 15 Minuten im JC-1 haltigen Medium (serumfrei) inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurde zu den Zellen PBS zugegeben und die Proben am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd. vermessen (Grün: ex./em., 485 nm./535 nm, Rot: ex./em., 535 nm/590 nm). Die Experimente wurden im Rahmen der Betreuung der Masterarbeit von Frau Christine Kern durchgeführt. Alle weiteren detaillierten Informationen können in ihrer Masterarbeit nachgelesen werden (Kern, 2013a)

3.5.4 Wachstumsanalyse der unbestrahlten und bestrahlten Zellpopulationen

Die Zellzahlbestimmung wurde in einem 24-stündigen Rhythmus mit Hilfe von Zellzähler Scepter™ wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden unbestrahlten und bestrahlten (direkt nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, 8 Gy) OLN-93 Zellen in jeden Kavität der 6-Loch-Platte mit einem Zellzahl $2,5 \times 10^5$ in 3 mL Kulturmedium ausgesät und die Zellzahlbestimmung erfolgte an folgenden 9 Tagen in Triplikaten. Während des gesamten Experiments wurde kein Mediumwechsel vorgenommen. Durch die Auftragung von Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit wurden die Wachstumskurven der beiden (unbestrahlt und bestrahlt) Zellpopulationen erstellt und unterschiedlichen Wachstumsphasen definiert. Anhand der Regressionsgrade innerhalb der exponentiellen Phase wurde die Verdopplungszeit bestimmt. Dieses Experiment wurden im Rahmen der Zusammenarbeit mit Frau Christine Kern durchgeführt und die Daten sind bereits in ihrer Masterarbeit aufgeführt (Kern, 2013a).

3.5.5 Alamar-Blue Assay

Mit Hilfe Alamar-Blue Assay kann metabolische Aktivität der Zellen analysiert werden. Alamar-Blue ist ein nicht fluoreszierende, wasserlösliche, nicht toxische, Zellmembran permeable Farbstoff, auch bekannt als Diazo-Resorcinol, Azoresorcin, Resazoin oder Resazurine. In die Zelle aufgenommen, fungiert der Farbstoff als Elektronakzeptor. Aufgrund seines Redoxpotentials kann Alamar-Blue durch unterschiedliche zelluläre und mitochondriale Moleküle und Enzyme reduziert werden, weshalb dieser Farbstoff nicht für die Bestimmung von mitochondrialer, sondern für die metabolische Aktivität der gesamten Zelle angewendet wird. Durch Reduktion wird das Alamar-Blue zu rosafarbenem und fluoreszierendem Resorufin umgewandelt. Die zelluläre metabolische Aktivität wird oft als Maß für die Zellvitalität diskutiert (Gray and Wickstrom, 1996; Rampersad, 2012)

Die Durchführung der Alamar-Blue Assays ist ausführlich in der Masterarbeit von Frau Meral Azakli (Azakli, 2013), die unter meiner Betreuung entstanden ist, beschrieben.

3.5.6 Neutralrot Assay

Der Farbstoff Neutralrot ist nicht membranpermeabel und wird nur von lebenden, vitalen Zellen über die Endozytose aufgenommen. In der Zelle wird der Farbstoff hauptsächlich in den Lysosomen akkumuliert. Der physiologische Zustand von Zellen korreliert mit der Farbstoffaufnahme, so dass bei zellulären Schädigungen Farbstoffaufnahme vermindert wird, was fluorometrisch erfasst werden kann. Dies erlaubt einen Rückschluss über die endozytosliche Aktivität der Zellen. Die Analyse der endozytosliche Aktivität der Zellen mittels Neutralrot wird oft als Maß für die Vitalität von Zellen genutzt (Borenfreund et al., 1988; Lowik et al., 1993; Modha et al., 1993).

In Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Röntgenstrahlung) auf die endozytosliche Aktivität von OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung analysiert. Dafür wurden je 5×10^4 unbestrahlte und bestrahlte Zellen in Triplikaten in 96 Lochplatten ausgesät. Die Zellen wurden mit der Neutralrotlösung für 2 Stunden inkubiert. Die Messungen erfolgen am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd. Einzelheiten über die Durchführung dieser Methode können in der Masterarbeit von Frau Meral Azakli nachgelesen werden (Azakli, 2013).

4 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung) auf OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung untersucht. Die Schwerpunkte der Untersuchungen lagen dabei vor allem in den mitochondrialen Eigenschaften der Zellen wie z. B. Unterschiede in der Menge der Atmungskettenproteine, in der Lipidzusammensetzung der Membran und in der Membranfluidität.

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei vielen zellulären Prozessen. Die wichtigsten Aufgaben der Mitochondrien sind die Produktionen von ATP in der oxidativen Phosphorylierung und Krebszyklus, Speicherung von Ca^{2+} , Einleitung von intrinsischen Apoptoseweg und ROS Produktion. In den letzten Jahren jedoch zeigten zahlreiche Studien, dass Mitochondrien beinahe bei allen zellulären Prozessen beteiligt sind. Darunter zählen Zellwachstum, Zelldifferentiation, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Alterungsprozess und Tumorigenese (Kotiadis et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch einige dieser physiologischen Eigenschaften untersucht.

Die Untersuchungszeitspanne von 14 Tagen wurde gewählt, da die Veränderungen an den Proteinen und Lipiden der Zelle im Fokus der Arbeit stehen. Diese liegen in der Zelle in mehreren Kopien vor. Somit können Schäden, die durch direkte Einwirkung von Strahlung entstehen, nur schwer identifiziert und analysiert werden. Diese Veränderungen können sich manifestieren, auch als Folge der Schädigungen in der genomischen oder mitochondrialen DNA und somit zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung auftraten.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Proteom- und Lipidom-Analyse, sowie Ergebnisse zur Analyse von einigen physiologischen Eigenschaften der Zelle, bzw. des Mitochondriums, gezeigt.

4.1 Protein-Analysen

Die meisten Studien zur Untersuchung der Effekte der ionisierenden Strahlung befassen sich vor allem mit Veränderungen und Schäden, die in der genomischen DNA oder in den Prozessen der DNA-Replikation, Zellteilung oder Zellproliferation entstehen. Trotz der essentiellen Bedeutung der Mitochondrien für eine Zelle oder den Organismus, kommen Forschungen, in denen sich Effekte der ionisierenden Strahlung auf diese beziehen, deutlich seltener vor. An diesem Punkt ist es wichtig zu betonen, dass diese Organelle eigene DNAs enthalten welche bis zu 1 % des gesamt DNA-Gehalts ausmachen (Dimauro et al., 2004). Sie sind das Kraftwerk der Zellen und produzieren ca. 95 % der gesamte Energie in Form von ATP (Rana et al., 2012). Außerdem sind Mitochondrien an der Kontrolle der vielen

zellulären Prozesse, wie auch an den Biosynthesen, Proliferation, Apoptose usw., beteiligt. Aus diesen Gründen ist es wichtig, die Einflüsse der Strahlung auf die Mitochondrien zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Analysen zur Untersuchung von mitochondrialen Proteinen durchgeführt. Proteinanalysen finden an nativ isolierten und mit mildem Detergens solubilisierten mitochondrialen Proteinen statt. Zuerst wurden die Proteine mit blau-nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) aufgetrennt. Mit Hilfe dieser Methode bleiben funktionelle und strukturelle Eigenschaften und Aktivität von Proteinen erhalten. So ist es möglich, die supramolekularen Organisationen von Proteinen zu untersuchen. In den Abschnitten 4.1.3 und 4.1.4 sind die, an diese Methode aufgebauten, Ergebnisse der Enzymaktivitäten der Komplexe I und IV der Atmungskomplexe dargestellt.

Die zweite Methode, die für die Proteomanalyse angesetzt wurde, ist die 2D BN/SDS Elektrophorese. Hierbei werden die Proteine nach der ersten nativen elektrophoretischen Auftrennung in der zweiten Dimension denaturiert, wodurch die supramolekularen Proteinorganisationen in einzelne Untereinheiten zerfallen. Dieses erlaubt zum einem, die Quantifizierung der einzelnen Untereinheiten, womit die Proteinmenge eines Proteins in unterschiedlichen Proben verglichen werden kann. Die Ergebnisse zur quantitativen Proteomanalyse sind in Abschnitt 4.1.2 gezeigt. Außerdem wurden die Proteinspots aus dem 2D-BN/SDS Gel ausgeschnitten, die Proteine aus Gelmatrix isoliert und anschließend mit MALDI-TOF-PMF identifiziert. Die Identifizierung der Proteine aus 2D-BN/SDS Gelen ist in Abschnitt 4.1.1. zusammengefasst.

4.1.1 Identifizierung der Proteine

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dencher ist die 2D-BN/SDS Elektrophorese etabliert und wurde schon in der Vergangenheit, sowohl für quantitative Analysen, als auch zur Auftrennung von Proteinen für die Identifizierung mittels MALDI-TOF-PMF benutzt.

Ein Großteil der, in 2D-BN/SDS Gelen sichtbaren, Proteine und Proteinuntereinheiten in mitochondrialen Proben aus Ratten wurde bereits von Reifschneider et al. (Reifschneider et al., 2006) identifiziert. Außerdem dienten weitere PMF-Analysen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dencher zur Verifizierung dieser Ergebnisse (Frenzel, 2011; Schäfer, 2011). Die Untersuchungen von Reifschneider et al. wurden zwar an verschiedenen Rattengeweben, darunter auch an Hirngewebe (Reifschneider et al., 2006), durchgeführt, dennoch können die Ergebnisse nicht zweifelsfrei für die OLN-93 Zellen übernommen werden. Aus diesem Grund

ist die Identifizierung möglichst vieler Proteine auf einem typischen 2D-BN/SDS-Gel dieser Zelllinie erforderlich.

Für die Identifizierung der Proteinspots wurden die Mitochondrien aus unbehandelten OLN-93 Zellen isoliert und mit Digitonin, in einem Verhältnis zu Protein 8 zu 1(w/w), solubilisiert. Pro Geltasche in der ersten nativen Dimension wurden 400 µg des Proteins aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In der zweiten Dimension denaturierten die supramolekularen Proteinorganisationen und Komplexe in ihre einzelnen Untereinheiten. Um möglichst viele Proteinspots identifizieren zu können, wurde großes BN Gel und großes SDS Gel (16 x 18 x 0,15 cm³, H x B x D) verwendet. Dadurch konnte ausreichend Probe analysiert werden und eine bessere Auftrennung war gewährleistet. In der Abbildung 8 ist das silbergefärbte 2D-BN/SDS Gel mit der OLN-93 Probe, welche für das Ausschneiden der Proteinspots verwendet wurde, abgebildet. Mit grünen Kreisen sind die erfolgreich identifizierten Proteinspots gekennzeichnet. Es wurden 98 Spots aus dem Gel ausgeschnitten und es konnten 64% (63 Spots) der Proteinspots identifiziert werden. Die Spots, die nicht identifiziert werden konnten, sind mit roten Kreisen markiert. Grund für die nicht erfolgreiche Identifizierung dieser Spots könnte die zu geringe Menge des Proteins sein. Auch die Überlagerung von mehreren unterschiedlichen Proteinen an einem Spot kann dazu geführt haben, dass die PMF Analyse keine Ergebnisse erzielte. Neben der farblichen Markierung sind alle ausgeschnittenen Spots zusätzlich mit Zahlen beschriftet. Vollständigkeitshalber wird diese Beschriftung beibehalten, um diese mit erhaltenen Ursprungsdaten der MALDI Analyse vergleichen zu können. Über dem silbergefärbten Gel ist, die dazu gehörige BN-Spur waagerecht montiert worden. Auf der BN Spur sind die Banden für das Komplex V Monomer (V₁) und Dimer (V₂), sowie für das HSP60 Protein beschriftet. Mit den Pfeilen sind die Auftrennungsrichtungen in der ersten und in der zweiten Dimension veranschaulicht. In eine separate Tasche des Gels ist Massenstandard LMW (rechts im Bild zu sehen), aufgetragen worden und dient als Referenz.

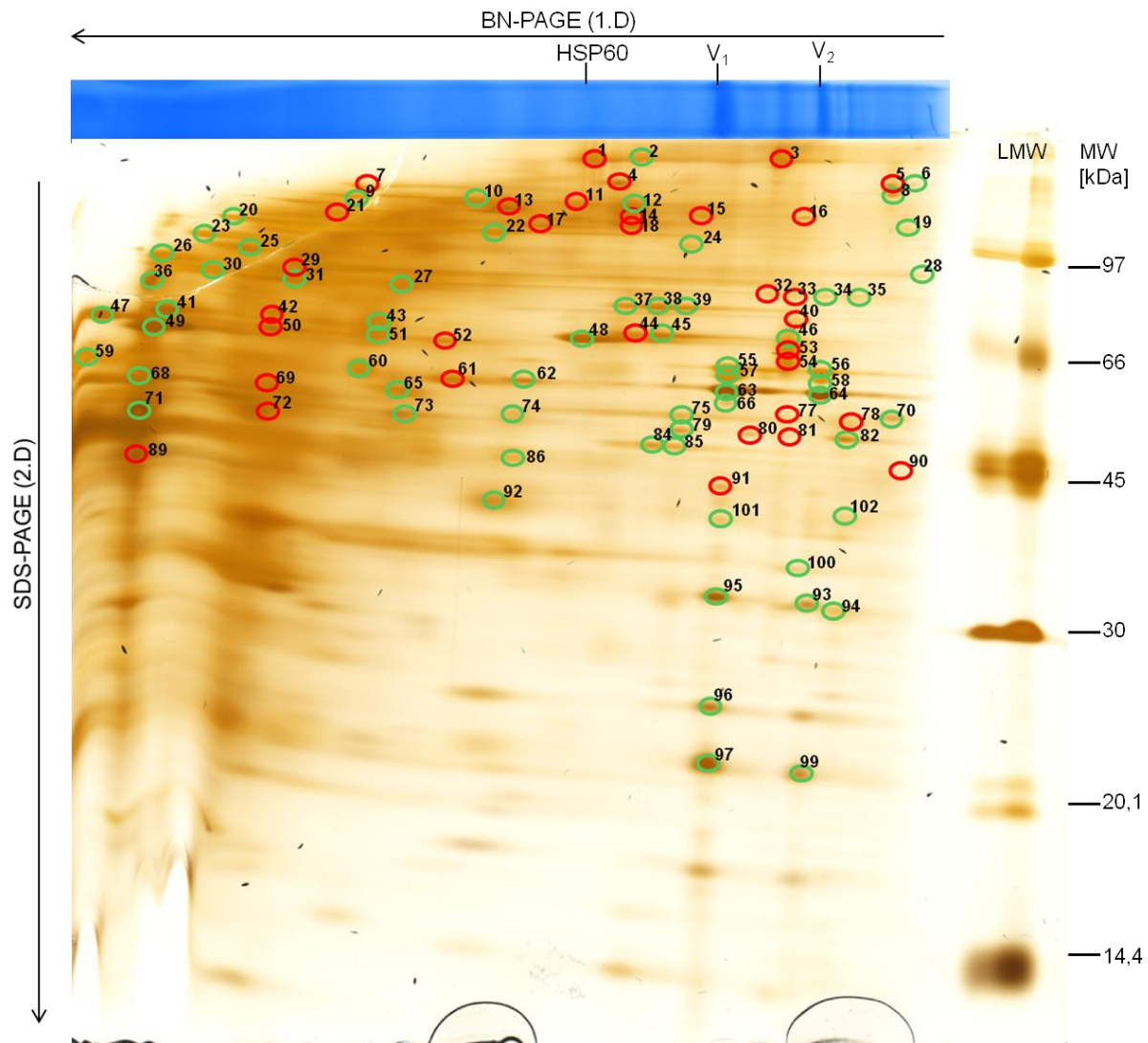


Abbildung 8: Silbergefärbtes 2D BN/SDS-Gel der Probe aus unbehandelten OLN-93 Zellen, welches für die Identifizierung der Proteine eingesetzt wurde. Rechts im Gel ist LMW-Massenstandard zu sehen. Proteine, die mittels *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) identifiziert werden konnten, sind durch grüne Kreise gekennzeichnet. Rote Kreise markieren Proteinspots, die nicht identifiziert werden konnten. Für die 1. Dimension wurden 400 µg mitochondriales Proteingemisch mit einem Digitonin zu Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w) solubilisiert. Die Laufrichtung in der 1. Dimension ist mit über dem Gel dargestellten Pfeil gezeigt. Anschließend wurden die Proteine denaturiert und durch eine weitere Elektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennungsrichtung in der 2. Dimension ist mit seitlich dargestelltem Pfeil wiedergegeben. Einzelne Proteine sind, nach der Silberfärbung, als gelbe bis dunkelbraune Spots in dem Gel sichtbar. Visualisierte Spots wurden anschließend ausgeschnitten, entfärbt und proteolytisch mit Trypsin verdaut. Nach dem Extrahieren der Peptide aus der Gelmatrix, wurden die Proben von Fr. Kratochwil und Hr. Marx am Bruker MALDI TOF TOF Ultraflex I (Gerät befindet sich in dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Düsseldorf) im Rahmen der Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Lehr, Dr. Sonja Hartwig und Waltraud Passlack vermessen. In Tabelle 1 findet sich eine detaillierte Auflistung der identifizierten Proteine. Numerische Nomenklatur der identifizierten Spots (grün) ist in der Tabelle 1 auch aufgelistet.

Die Messungen wurden am Bruker MALDI TOF TOF Ultraflex I Massenspektrometer am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ), Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie in

Düsseldorf von Dr. Stefan Lehr, Dr. Sonja Hartwig und Waltraud Passlack sowie von Dipl.-Chem. Manuela Kratochwil und Dipl.-Chem. Sven Marx aus der Arbeitsgruppe Dencher durchgeführt. Die dabei angewendete Methode ist PMF. Zur Verifizierung durchläuft das Gerät automatisch einen zweiten Messlauf, wobei PMF in Kombination mit PMF-MS-MS durchgeführt wird. Die Signifikanz der Identifikationsergebnisse ist durch *score* angegeben. *Score* beschreibt die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Übereinstimmung der Messung ab. Bei der PMF Methode sind die Ergebnisse mit einem *score* größer als 51 signifikant ($p < 0,05$). Die Ergebnisse, die verifiziert wurden und somit über PMF und zusätzlich über PMF MS-MS ermittelt werden könnten, gelten automatisch als signifikant. In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Identifizierung der Proteine aufgeführt. Hieraus kann anhand von *score* und Methode (PMF oder PMF und zusätzliche Verifizierung mit PMF MS-MS) gesehen werden, dass alle Proteine mit hoher Genauigkeit nachgewiesen worden sind. Die Proteine, die nur über PMF nachgewiesen wurden, sind signifikant, da der ermittelte *score* über 51 beträgt. Die Identifizierungen von Proteinen die über die Kombination der beiden Methoden erfolgten, sind signifikant auch mit *score* kleiner als 51. In dieser Tabelle sind außerdem die Eintrittscodes der Datenbank (*SwissProt*, *Accession*), molekulare Massen der identifizierten Proteine (MW [kDa]), prozentuale Anteile der übereinstimmenden Proteinsequenz (SC [%]), sowie Spot-Nomenklatur (Spot Nr.), welche sich auch in der Abbildung 8 wiederfindet, aufgeführt. Aus der Spalte „Methode“ kann abgelesen werden, bei welchen Proteinen die Identität nur über PMF ermittelt wurde und bei welchen diese noch verifiziert werden konnten. Mitochondrialen Protein sind grau hinterlegt.

Tabelle 1: Liste der Proteine identifiziert mittels PMF und zum Teil verifiziert mittels Kombination von PMF und PMF MS-MS Methoden. Aufgeführt sind Proteinname, Eintrittscode (*Accession*) bei Datenbank *SwissProt*, molekulare Masse (MW) in kDa, *score*, verwendete Methode, prozentuale Anteile der erkannten Proteinsequenz (SC) und Spotnummer, welche sich auch in der Abbildung 8 wiederfindet. Bei einigen Spots war die Verifizierung mit PMF MS-MS Kombination nicht möglich. Alle aufgeführten Ergebnisse sind signifikant. Mitochondriale Proteine sind grau hinterlegt.

Name	<i>SwissProt</i> <i>Accession</i>	MW [kDa]	<i>Score</i>	Methode	SC[%]	Spot Nr.
Biotinidase	BTD_RAT	58.0	23.0	PMF	3.1	2
				PMF+MS-MS		
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	40.1	PMF	2.6	6
				PMF+MS-MS		
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	45.1	PMF	2.6	8
				PMF+MS-MS		

Name	SwissProt Accession	MW [kDa]	Score	Methode	SC[%]	Spot Nr.
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LPPRC_RAT	156.6	66.1	PMF	20.3	9
Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_RAT	111.2	46.7	PMF PMF+MS-MS	1.3	10
Integrin beta-1	ITB1_RAT	88.4	34.6	PMF PMF+MS-MS	0.0	12
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	ODO1_RAT	116.2	111.0	PMF	18.3	19
Endoplasmin	ENPL_RAT	92.7	140.0	PMF	30.5	20
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_RAT	83.2	47.6	PMF PMF+MS-MS	1.9	20
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_RAT	83.2	38.6	PMF PMF+MS-MS	1.9	22
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_RAT	83.2	94.0	PMF	29.3	23
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1_RAT	80.4	37.5	PMF PMF+MS-MS	2.0	23
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	47.3	PMF PMF+ MS-MS	2.6	24
Aconitate hydratase, mitochondrial	ACON_RAT	85.4	56.0	PMF PMF+MS-MS	2.1	25
Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_RAT	72.7	147.0	PMF	31.1	26
Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_RAT	72.7	39.1	PMF PMF+MS-MS	1.7	27
Actin-binding Rho-activating protein	ABRA_RAT	42.9	58.0	PMF	29.6	28
78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT	72.3	43.7	PMF PMF+MS-MS	2.8	30
78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_RAT	72.3	59.0	PMF PMF+MS-MS	5.4	31

Name	SwissProt Accession	MW [kDa]	Score	Methode	SC[%]	Spot Nr.
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUS1_RAT	79.4	49.4	PMF PMF+MS-MS	2.2	34
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUS1_RAT	79.4	30.0	PMF PMF+MS-MS	2.2	35
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	43.6	PMF PMF+MS-MS	2.6	36
Dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1_RAT	68.3	92.0	PMF	23.6	37
Dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1_RAT	68.3	45.9	PMF PMF+MS-MS	2.5	38
Dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1_RAT	68.3	55.5	PMF PMF+MS-MS	2.0	39
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT	60.9	56.3	PMF PMF+MS-MS	3.1	41
WD repeat-containing protein 1	WDR1_RAT	66.1	35.3	PMF PMF+MS-MS	1.7	43
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	48.4	PMF PMF+MS-MS	2.6	45
T-complex protein 1 subunit alpha	TCPA_RAT	60.3	78.4	PMF	24.3	46
Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT	56.9	63.0	PMF	28.3	47
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_RAT	60.9	67.2	PMF PMF+MS-MS	3.8	48

Name	SwissProt Accession	MW [kDa]	Score	Methode	SC[%]	Spot Nr.
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_RAT	56.6	46.8	PMF PMF+MS-MS	2.4	49
Protein disulfide-isomerase	PDIA1_RAT	56.9	50.8	PMF PMF+MS-MS	3.7	51
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_RAT	59.7	39.4	PMF PMF+MS-MS	2.4	55
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_RAT	59.7	33.9	PMF PMF+MS-MS	2.4	56
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_RAT	59.7	159.0	PMF PMF+MS-MS	46.5	57
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_RAT	59.7	58.8	PMF PMF+MS-MS	2.9	58
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	47.0	PMF PMF+MS-MS	2.6	59
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	41.3	PMF PMF+MS-MS	2.6	60
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_RAT	56.3	36.7	PMF PMF+MS-MS	2.8	62
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_RAT	56.3	43.2	PMF PMF+MS-MS	2.6	63
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_RAT	56.3	57.9	PMF PMF+MS-MS	3.6	64
Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT	54.4	66.1	PMF PMF+MS-MS	3.6	65
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_RAT	56.3	66.4	PMF PMF+MS-MS	2.6	66
Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_RAT	48.1	41.2	PMF PMF+MS-MS	3.0	68
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	ODO2_RAT	48.9	42.6	PMF PMF+MS-MS	1.8	70

Name	SwissProt Accession	MW [kDa]	Score	Methode	SC[%]	Spot Nr.
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	60.5	PMF PMF+MS-MS	2.6	71
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	60.5	PMF PMF+MS-MS	2.6	72
2',3'-cyclic-nucleotide 3'- phosphodiesterase	CN37_RAT	47.2	65.7	PMF	21.9	73
Actin-related protein 3	ARP3_RAT	47.3	87.8	PMF	37.8	74
Actin-related protein 3	ARP3_RAT	47.3	43.8	PMF PMF+MS-MS	5.0	75
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	QCR2_RAT	48.4	48.2	PMF PMF+MS-MS	3.1	79
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	QCR2_RAT	48.4	113.0	PMF	28.1	82
Dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	QCR2_RAT	48.9	42.6	PMF PMF+MS-MS	2.5	84
Dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	OST48_RAT	48.9	32.6	PMF PMF+ MS-MS	2.0	85
Actin-related protein 2	ARP2_RAT	44.7	34.9	PMF PMF+ MS-MS	3.6	86
Keratin, type II cytoskeletal 75	K2C75_RAT	59.0	40.1	PMF PMF+ MS-MS	1.8	92
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	49.6	PMF PMF+ MS-MS	2.6	93
Glial fibrillary acidic protein	GFAP_RAT	49.9	46.7	PMF PMF+ MS-MS	2.6	94
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATPG_RAT	30.2	52.0	PMF PMF+ MS-MS	5.5	95

Name	SwissProt Accession	MW [kDa]	Score	Methode	SC[%]	Spot Nr.
ATP synthase subunit b, mitochondrial	AT5F1_RAT	28.9	58.8	PMF PMF+ MS-MS	3.1	96
ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATPO_RAT	23.4	26.0	PMF PMF+ MS-MS	6.6	97
ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATPO_RAT	23.4	34.9	PMF PMF+ MS-MS	6.6	99
Actin-related protein 2	ARP2_RAT	44.7	42.0	PMF PMF+ MS-MS	3.6	100
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_RAT	59.7	31.5	PMF PMF+ MS-MS	2.4	101
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	NDUA9_RAT	42.5	53.6	PMF PMF+ MS-MS	3.4	102

Laut Datenbank wurden insgesamt 27 von 63 Spots identifiziert als bekannte mitochondriale Proteine. Hierbei handelt es sich zum Teil um gleiche Proteine die aus unterschiedlichen überstrukturellen Organisationen oder Komplexen stammen. Bei den restlichen Proteinen ist die mitochondriale Lokalisation nicht auszuschließen, da immer wieder Proteine die bislang einem bestimmten Zellkompartiment zugeordnet wurden auch in anderen Kompartimenten nachgewiesen werden. Dennoch kann gesagt werden, dass bei dem großen Teil der identifizierten Proteine es sich um die nicht mitochondrialen Proteine handelt. Bei der hier angewandten „crude“ Aufreinigungsverfahren von Mitochondrien wird wegen Aufrechterhaltung von mitochondrialer Aktivität und Ausbeute auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet und somit ist die Kontamination mit Proteinen aus anderen Zellkompartimenten zu erwarten. Nach der Silberfärbung konnten zum Teil in hier angewandtem großem Gel auch sehr nah beieinander liegende Proteinspots getrennt ausgeschnitten werden. Bei einigen zeigte die MALDI-TOF Identifizierung jedoch, dass es sich hierbei um die gleiche Proteinuntereinheiten handelt (siehe Abbildung 8, Spotnummern: 55/57, 56/58, 63/66; α und β Untereinheiten von Komplex V). Die unterschiedlich posttranslationale Modifikationen von den Proteinen könnten das unterschiedliche Laufverhalten von den Proteinen in Gel verursacht haben. Aufgrund räumlichen Nähe zu der mitochondrialen Elektronentransportkette, dem Produktionsort von ROS, wurde Komplex V bereits als ein Hauptziel für ROS-induzierte oxydative Modifikationen beschrieben (Rexroth et al., 2012). Betrachtet man die in der Tabelle 1 aufgeführte Identitäten der Proteine mit

deren Lage in 2D BN/SDS Gel (siehe Abbildung 8) so können die Rückschlüsse über die ursprünglichen Proteinassamblierungen gewonnen werden. So z. B. kann anhand von der Lage der einzelnen Untereinheiten von Komplex V der Atmungskette eindeutig nachgewiesen werden, dass Komplex V in den isolierten Mitochondrien aus OLN-93 Zellen als Monomer und als Dimer vorliegt. Auch für weitere identifizierte Proteine (u. a. HSP60, HSP90 β) können mehrere Assemblierungsstrukturen beobachtet werden. Zum Beispiel kann die Identifizierung von HSP60 Protein bei der Analyse von der Spotnummern 41 und 48 erfolgen. Die Lage von Spotnummer 41 unterhalb der BN-Spur deutet auf das HSP60 monomere Struktur, während sich bei dem zweiten Spot um einen HSP60 Heptamer handelt. In diesem Abschnitt wird nicht näher auf die identifizierten Proteine eingegangen. Über einige ausgewählte Proteine werden im Zusammenhang mit quantitativer Analyse der Proteinmenge, sowie bei den Analysen von Enzymaktivitäten, weitere Ergebnisse vorgestellt (siehe Abschnitte 4.1.2 und 4.1.3).

4.1.2 Quantitative Analyse der Proteinmenge in Abhängigkeit von Bestrahlung

Zelluläre Antworten, bei Einwirkung von Stress, manifestieren sich unter anderem durch Veränderungen in der Proteinzusammensetzung und in der Proteinabundanz der Zelle. So zum Beispiel wird die Expression einiger Chaperone unter Stressbedingungen für die Zelle (z.B. bei erhöhter Temperatur, chemischem Stress oder Bestrahlung) induziert oder verstärkt, während die Expression von anderen Proteinen gehemmt wird. In dieser Arbeit wurde die Expression von Proteinen, mit einem besonderen Blick auf Komplexe und Superkomplexe der Atmungskette und Stressproteine, untersucht.

Die Proteinmenge wurde analysiert mittels 2D-BN/SDS Elektrophorese. Hierbei wurden die mit 8 Gy (Röntgenstrahlung) bestrahlten OLN-93 Zellen mit unbehandelten (Kontrolle) Zellen untereinander verglichen. Die Mitochondrien wurden an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy) aus je $1,5 \times 10^6$ Zellen isoliert. Parallel und gleichartig dazu wurden die Mitochondrien aus unbestrahlten (Kontrolle) Zellen isoliert. Bis zur Solubilisierung und elektrophoretischen Analyse der Proben, wurden die isolierten Mitochondrien bei -80°C gelagert. Die mitochondrialen Proteine wurden analog zur Abschnitt 3.3.3 solubilisiert (Digitonin zu Protein Verhältnis 8 zu 1 w/w). Anschließend wurde 2D-BN/SDS Elektrophorese durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine in den Gelen mittels zwei unterschiedlicher Färbeverfahren visualisiert. Zum einem mit SYPRO® Ruby-Farbstoff und zum anderen mit Silber. SYPRO® Ruby ist ein Fluoreszenzfarbstoff (ex. / em $\lambda=470$ nm / $\lambda=618$ nm.), der mit größerem linearen dynamischen Bereich und einer Detektionsgrenze von 1 ng Protein pro Spot für die

Quantifizierung von Proteinen geeignet ist (Wheelock et al., 2006). Die silbergefärbten Gele eignen sich für die quantitativen Analysen nicht, aber sie bieten eine bessere Sichtbarkeit von Proteinspots. Für die quantitative Analyse wurden Sypro Ruby gefärbte Gele verwendet. Die Detektion der gefärbten Proteine erfolgte mittels eines CCD-Kamerasystems. Anschließend fand die densitometrische, quantitative Auswertung der Proteinmengen mit der Delta2D Software statt.

4.1.2.1 Proteine der Atmungskette

In der Abbildung 9 ist ein SYPRO Ruby gefärbtes Gel dargestellt. Hier sind die analysierten Proteinspots der Atmungskette gekennzeichnet. Die Nomenklatur der Spots ist der Tabelle 1 (siehe Abschnitt 4.1.1) zu entnehmen. Einige Spots sind mit zwei Nummern gleichzeitig beschriftet, da sie bei der Ausschneidung von Spots für die PMF Analyse als zwei unterschiedliche gesehen wurden. Die Identifizierung zeigte, dass es sich dabei um ein Protein handelt. Vollständigkeitshalber wurde diese Beschriftung beibehalten, um die hier vorgestellten Ergebnisse mit Ursprungsdaten der MALDI-Analyse vergleichen zu können. Die quantitativen Analysen der Proteinmenge fanden an aufgetrennten Proben in kleineren Gelen ($10,5 \times 10 \times 0,15 \text{ cm}^3$, H x B x D) statt, wodurch die Auflösung schlechter und die Zuordnung der Proteine etwas erschwert wurde. Des Weiteren vergleicht man die Proteinmenge, die hier analysiert wird, mit den Proteinmengen die für die Identifizierung der Proteine eingesetzt wurde, so ergibt sich ein großer Unterschied. Für die massenspektrometrische Identifizierung wurde $400 \mu\text{g}$ Proteingemisches solubilisiert und aufgetrennt, während bei der densitometrischen quantitativen Analyse der Proteinmenge das Proteingemisch aus $1,5 \times 10^6$ Zellen untersucht wurde. Aus dieser Anzahl der Zellen ergab sich im Durchschnitt eine Proteinmasse von $70 \mu\text{g}$ bis $80 \mu\text{g}$. Das bedeutet, dass in den Proteinmenge Analysen 5 bis 6 Mal geringere Mengen des Proteingemisches auf das Gel aufgetragen wurde. Vergleicht man das silbergefärbte Gel aus Abbildung 8 mit dem Sypro Ruby gefärbten Gel in Abbildung 9 so sieht man, dass viele Spots im Sypro Ruby gefärbten Gel nicht sichtbar sind. Neben den geringeren Proteinmengen könnten die unterschiedlichen Färbverhalten der beiden Farbstoffe dieses verursachen. Alle roten Spots markieren die Proteinuntereinheiten des Komplexes V. Die blauen Spots konnten dem Komplex I und die grünen dem Komplex III_2 zugeordnet werden. In Rahmen dieser Arbeit konnten keine Proteinuntereinheiten der Komplexe II und IV der Atmungskette analysiert werden. Weiterhin ist in der Abbildung 9, oberhalb von dem SDS Gel, eine BN-Spur waagerecht angebracht worden. Nach der Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension und nach der Coomassie-Blue Färbung können die drei Proteinbanden eindeutig zugeordnet werden.

Dabei handelt es sich um Komplex V Dimer (V_2 , 1500 kDa), Komplex V Monomer (V_1 , 750 kDa) und um das HSP60 Heptamer (420 kDa).

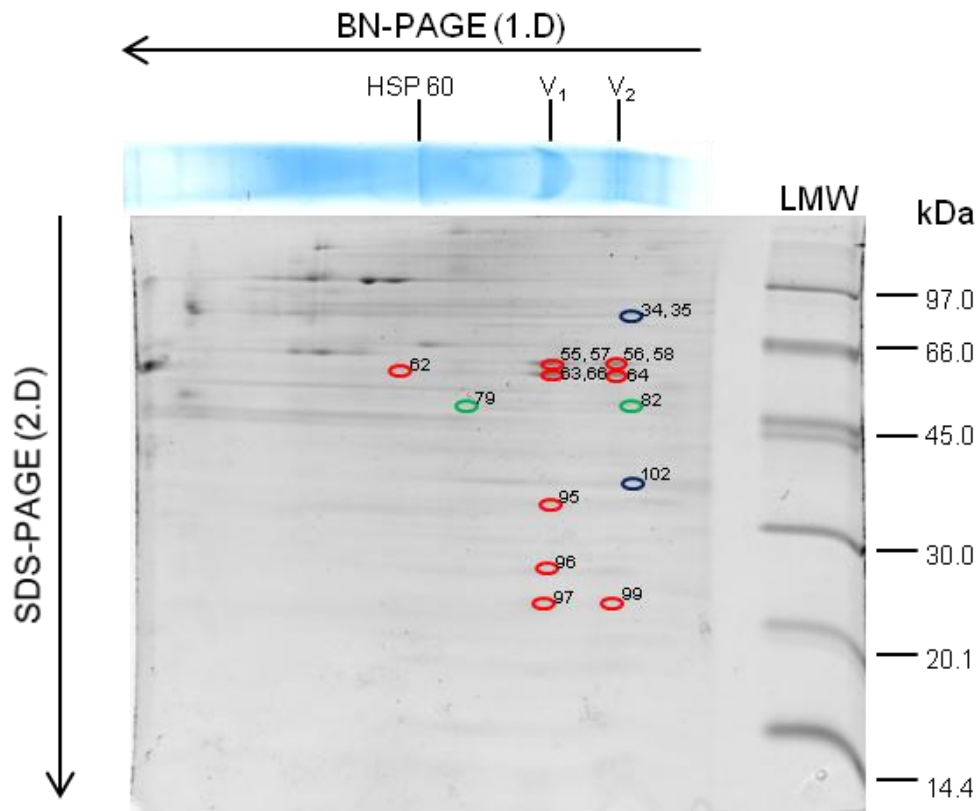


Abbildung 9: SYPRO Ruby gefärbtes 2D BN/SDS Gel. Ein Exemplar für die Gele die für die Analysen der Proteinmenge in Abhängigkeit von der Bestrahlung produziert wurden. Die Probe aus je $1,5 \cdot 10^6$ Zellen wurde in Gelen ($10,5 \times 10 \times 0,15 \text{ cm}^3$, H x B x D) analysiert. Markiert sind Proteinspots der Atmungskette, deren Proteinmenge mithilfe Delta2D Software quantifiziert wurde. Die Spots sind nummeriert wie im Abschnitt 4.1.1. Zusätzlich sind Spots farblich gekennzeichnet. Rote Spots zeigen die Proteine des Komplexes V. Grün dargestellt sind die Proteine des Komplexes III und blau des Komplexes I. Über dem Gel ist BN-Spur, mit beschrifteten Banden für HSP 60, V_1 (Komplex V Monomer) und V_2 (Komplex V Dimer) dargestellt. Mit Feilen ist die jeweilige Auftrennungsrichtung bei der 1. und 2. Dimension gezeigt. Pro Gel wurde eine Tasche mit $1,5 \mu\text{L}$ Proteinmassenstandards (LMW, [kDa]) aufgetragen.

Die oben beschriebene Methode und die Analyse mit Delta2D Software ermöglichen relative Vergleiche der Proteinmenge eines Proteins, zwischen unterschiedlichen Proben. Allerdings ist es nicht möglich die Menge der unterschiedlichen Proteine untereinander zu vergleichen, da das Färbeverhalten der Proteine unterschiedlich sein kann. Außerdem ist die Färbeintensität von der Masse des Proteins abhängig.

Die relative Proteinmenge der einzelnen Proteine der Proben in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung wurde ermittelt und mit relativen Proteinmengen aus den unbestrahlten Zellen verglichen. Das Experiment wurde im Rahmen der Arbeit dreimal wiederholt. Das heißt, die drei Experimente wurden unabhängig voneinander und zu verschiedenen Zeiten

durchgeführt. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass sich die zu untersuchenden Zellen in gleichen Passagen befanden, um eventuelle Seneszenz-bedingte Einflüsse ausschließen zu können.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Analyse vorgestellt. Dabei werden für jeden der drei Experimente einzelne Werte in Diagrammen dargestellt, da eine statistische Auswertung mit drei Wiederholungen (Replikaten) nicht sinnvoll ist. Wie man sowohl in der Abbildung 9 als auch in dem Abschnitt 4.1.1 sehen kann, ist der Anteil an den Proteinspots, die der Atmungskette zugeordnet werden können, in 2D BN/SDS Gelen gering. Dieses kann zum Teil an der „*crude*“ Isolierungsmethode von Mitochondrien liegen. Eine weitere Folge der „*crude*“ Isolierungsmethode ist, das Vorhandensein von zytosolischen Proteinen, sowie von Proteinen aus anderen Zellkompartimenten wie z.B. endoplasmatisches Retikulum. Allgemein kann man sagen, dass die 2D BN/SDS-Analyse von Mitochondrien aus kultivierten Zellen schwieriger ist als aus Gewebeproben. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dencher wurde schon öfter beobachtet, dass bei gleicher Proteinmenge die Proteinspots der Zellkulturproben, verglichen zu Gewebeproben, wesentlich schwächer nach der SYPRO Ruby Färbung, wie auch nach anderen Färbeverfahren sichtbar sind (Frenzel, 2011).

Mit Hilfe Delta2D Software wurde die Proteinmenge von zwei Untereinheiten des Komplexes I analysiert. Bei dem blau-markierten Spot 34/35 handelt es sich um NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit. Dies ist die größte Untereinheit des Komplexes I und eine Komponente des Eisen-Schwefel-Fragments des Enzyms (Iuso et al., 2006). Die Position von Spot 34/35 unterhalb der BN-Spur zeigt, dass es sich hierbei um NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit handelt, welche aus einem Superkomplex stammt. Zieht man eine vertikale Linie zwischen diesem Spot und der BN-Spur so erkennt man, dass dieses Protein bei höherer Masse als Komplex V_2 (1500 kDa) in der BN-Spur lag. Die Superkomplexe $I_1III_2IV_{0-3}$ liegen im Größenbereich zwischen 1500 und 2100 kDa (Frenzel et al., 2010). Die Auswertung der relativen Proteinmengen von der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit aus den Superkomplexen, in den mit 8 Gy bestrahlten und unbestrahlten (Kontrolle) Proben, die an den Tagen 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung aus OLN-93 Zellen isoliert worden sind, ist in der Abbildung 10 dargestellt.

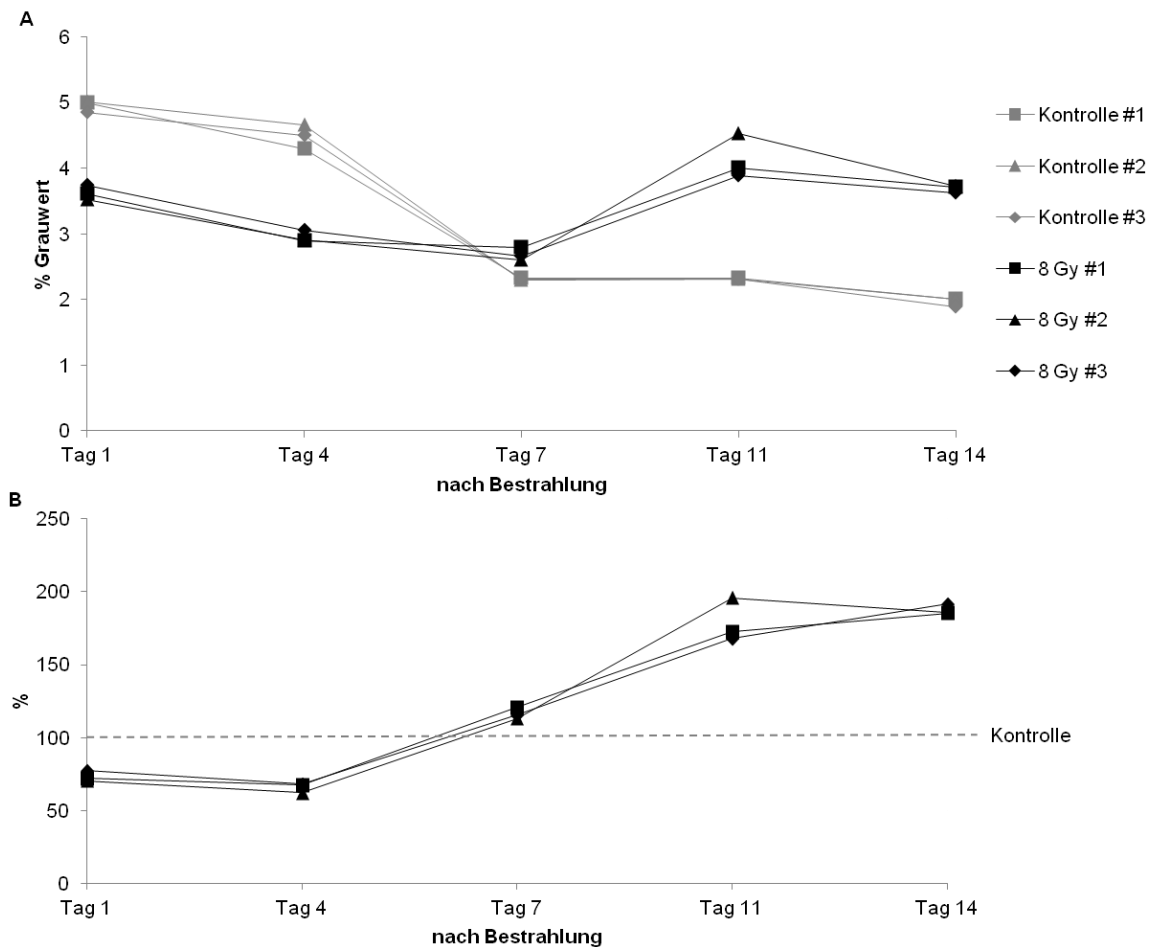


Abbildung 10: Relative Menge von NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit (Komplex I) in Superkomplexen in Mitochondrien aus OLN-93 Zellen. Verglichen sind unbestrahlte (Kontrolle, grau) und bestrahlte (Röntgenstrahlung, 8 Gy, schwarz) mitochondriale Proben, welche an den Tagen 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung isoliert wurden. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und im Diagramm sind Einzelwerte dargestellt (A). Außerdem dargestellt sind die Proteinmengen im prozentualen Verhältnis zu entsprechender Kontrolle (B) Symbolformen sind gleich bei den Proben, die zu einem gleichen Experiment gehören. Die relative Menge des Proteins ist durch % Grauwert angegeben. % Grauwert ist der prozentuale Anteil des Grauwertes von Spot 34/35, bezogen auf den Grauwert aller Proteinspots eines Gels, die eindeutig in allen Proben zu erkennen sind. Die Replikate derselben Probe liegen gut beieinander. Relative Proteinmengen von bestrahlten und unbestrahlten Proben sind bei allen Zeitpunkten nach der Bestrahlung unterschiedlich. An Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung ist die Menge von NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit geringer in den bestrahlten Mitochondrien. Bei späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung kann eine sprunghafte Zunahme verglichen zu unbestrahlten Proben beobachtet werden.

Die relative Proteinmenge ist durch den prozentualen Anteil des Grauwerts von Spot (Daten befinden sich im Anhang), bezogen auf den Gesamtgrauwert aller Spots, die eindeutig den zu untersuchenden Proben zugeordnet werden können. Das heißt, diese sind bei allen analysierten Gelen zu erkennen. Die Markerbanden, Gelränder, sowie Farbstoffreste zählen nicht zu dem Gesamtgrauwert. Zwischen den Replikaten stimmen die Werte sehr gut überein. Bei einigen Zeitpunkten liegen diese exakt übereinander, weshalb nicht alle

Datensymbole auf dem Diagramm erkennbar sind. Die ermittelten Mengen des Proteins wurden für jedes Experiment einzeln dargestellt (siehe Abbildung 10 A). Die Werte, die zu einem Experimentdurchlauf gehören, sind mit dem gleichen Symbol dargestellt. Die Menge von NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit liegt an Tag 1 und 4 in Mitochondrien aus bestrahlten Zellen bei ca. 3,6 bzw. ca. 2,9 %, während sie in den unbestrahlten Proben bei ca. 5 bzw. ca. 4,4 % liegt. Diese Abnahmen der Proteinmenge an Tag 1 und 4 könnten durch die Einwirkung von Röntgenstrahlung auf die Zellen hervorgerufen werden. Bis zum Tag 7 nach der Bestrahlung nimmt der Gehalt des Proteins in beiden Probengruppen ab. An Tag 7 liegen bei beiden Probengruppen in etwa gleiche Proteinmengen von NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit vor. Ab dem Tag 11 kann eine starke Zunahme des Proteingehalts in bestrahlten Proben nachgewiesen werden, während die relative Menge in unbestrahlten Proben weiter geringfügig abnimmt. Die Menge dieses Proteins in unbestrahlten Proben ändert sich innerhalb von 14 Tagen unerwartet stark. In dieser kurzen Zeit sollten in eine immortalisierte permanente Zelllinie, wie OLN-93, keine Seneszenz-bedingten Effekte auftreten. Bei diesen Proben nimmt die relative Menge von NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit um Faktor 2,5 von Tag 1 bis 14 ab. Die zeitunabhängigen Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben sind in Abbildung 10 B einfacher zu erkennen. Direkt nach der Bestrahlung (Tag 1) reduziert sich die Menge von NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit auf ca. 75 % bezogen auf die Kontrollproben. Am Tag 4 nach der Bestrahlung ist im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme der Proteinmenge um ca. 35 % erkennbar. An Tag 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung nimmt die Menge dieser Untereinheit in den bestrahlten, verglichen zu den unbestrahlten, Proben zu.

Zweite Proteinuntereinheit des Komplexes I, welche analysiert wurde, ist NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9. NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9 (39 kDa) beteiligt sich nicht in der enzymatischen Aktivität des Komplexes I. Es wird postuliert, dass sie für die Assemblierung des Komplexes notwendig ist (Cho et al., 2012; Leong et al., 2012). In der Abbildung 9, auf dem 2D BN/SDS Gel ist das Protein als blau markierter Spot mit der Nummer 102 gekennzeichnet. Der Spot liegt in dem 2D BN/SDS Gel vertikal unter dem Spot 34/35 und ist somit eine weitere Komplex I Untereinheit aus einem Superkomplex. Die Analyse der Proteinmenge dieser Untereinheit ist in der Abbildung 11 dargestellt. Die Darstellung für alle Diagramme der Proteinmengeanalyse erfolgte wie oben für Abbildung 10 beschrieben.

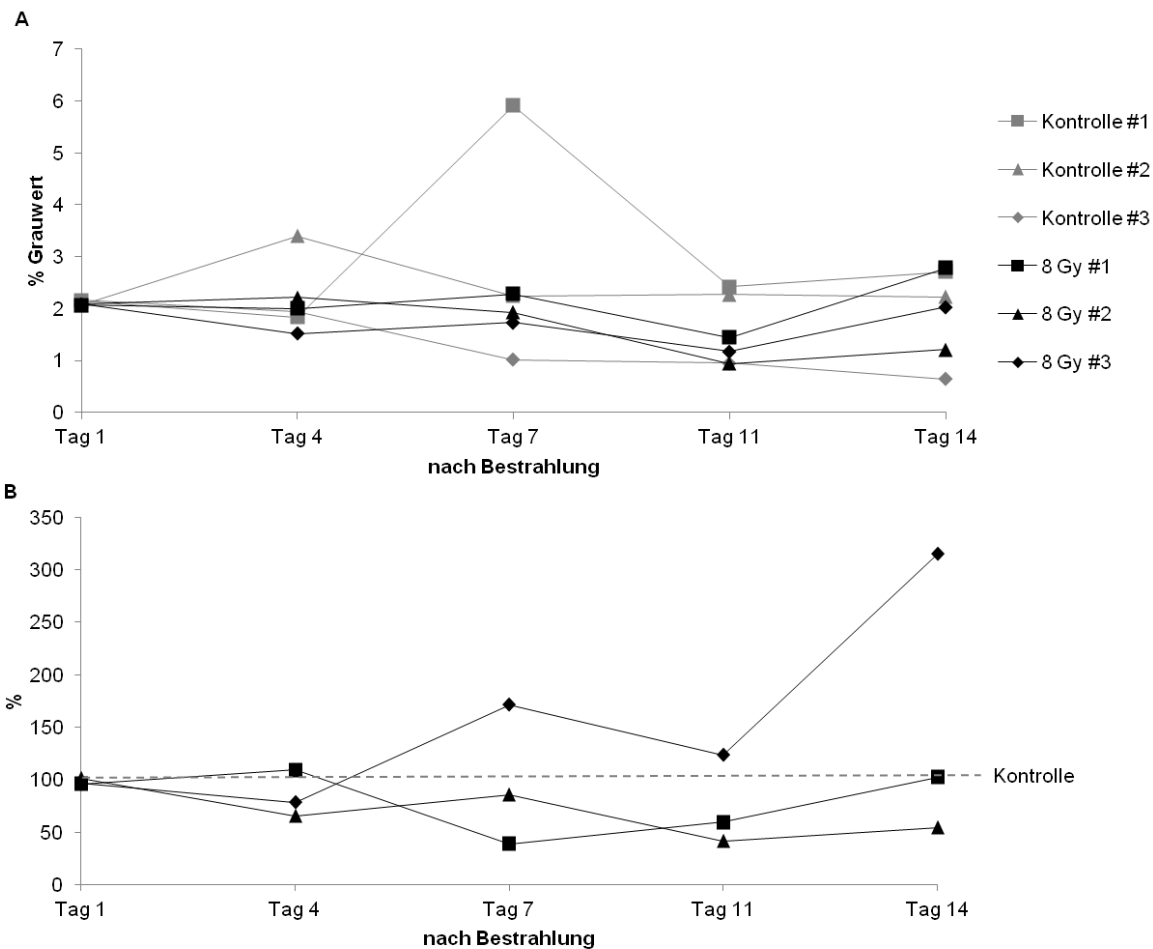


Abbildung 11: Relative Proteinmenge von NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9 (Komplex I) in Superkomplexen in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8Gy) OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung. Nach der Lage des Spots (Spot 102) in dem 2D BN/SDS Gel bildete diese Untereinheit ursprünglich ein Komplex I eines Superkomplexes. Die relative Proteinmenge ist durch % Grauwert angegeben (A). Dargestellt sind außerdem Proteinmengen in bestrahlten Proben im prozentualen Verhältnis zu entsprechender Kontrolle (B). Die relative Proteinmenge von NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9 unterscheidet sich in bestrahlten und unbestrahlten Proben nicht. Zwischen einzelnen Untersuchungszeitpunkten können auch keine Unterschiede in der Menge dieses Proteins gesehen werden..

Die Menge der Komplex I Untereinheit, NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9, welche ursprünglich aus einem Superkomplex stammt, unterscheidet sich in allen untersuchten Zeitpunkten nach der Bestrahlung nicht zwischen unbestrahlten und mit 8Gy (Röntgenstrahlung) bestrahlten mitochondrialen Proben. Angesichts der Tatsache, dass es sich hierbei um die Daten aus drei völlig unabhängigen Experimentdurchführungen handelt (Bestrahlung, Isolierung, Solubilisierung, usw.), kann auch hier gesagt werden, dass einzelne Replikate dicht beieinander liegen (ausgenommen einer unbestrahlten Probe am Tag 7). Die Menge dieser Untereinheit des Komplexes I liegt im Bereich zwischen ca. 0,7 und 3,5 % bei allen Proben. Am Tag 7 zeigt Replikatnummer 2 der unbestrahlten Probe

einen Wert von ca. 6 % was mehr als doppelt ist, verglichen zu den anderen Werten am selben Tag. Hierbei könnte es sich um einen Ausreißer handeln. Bei der Menge von NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9 konnten, sowohl bei unbestrahlten (ausgenommen Tag 7, #2), als auch bei bestrahlten mitochondrialen Proben keine großen Veränderungen innerhalb von der Untersuchungszeitspanne von 14 Tagen festgestellt werden.

Die beiden hier analysierten Proteinuntereinheiten des Komplexes I befinden sich in dem 2D BN/SDS Gelbereich, in welchem Proteinuntereinheiten der Superkomplexe zu erwarten sind. Es konnten keine Untereinheiten des Komplexes I detektiert und ausgewertet werden, welche dem individuellen Komplex I zugeordnet werden könnten. Der individuelle Komplex I ist ca. 1000 kDa groß und deren Proteinuntereinheiten würden in dem 2D BN/SDS Gel, ausgehend von der BN Spur, in eine vertikale Linie zwischen Komplex V Monomer und Dimer liegen. Dieses Resultat für OLN-93 Zellen liegt in Übereinstimmung mit der Arbeit zu Komplex I Vorkommnissen in Rattenhirn von Frenzel *et al*, wo ebenfalls nur Komplex I in Superkomplexen nachgewiesen werden konnte (Frenzel et al., 2010).

Wie in der Abbildung 9 gezeigt, können zwei Proteinspots (grün) dem Komplex III₂ zugeordnet und deren Proteinmengen analysiert werden. Es handelt sich hierbei um die gleiche Untereinheit, die jedoch aus unterschiedlichen Proteinorganisationen stammen. Diese Untereinheit ist die ca. 48 kDa schwere Cytochrom-b-c1-Komplex-Untereinheit 2, bekannt auch als Core 2 Untereinheit. Diese ist für die Assemblierung des Komplexes III₂ notwendig (Hosokawa et al., 1989). Der Spot 82 befindet sich in dem 2D BN/SDS Gel in vertikaler Linie mit den beiden Spots des Komplexes I und stammt ursprünglich aus dem hochmolekularen Teil der BN Spur, in der sich Superkomplexe befinden (1500 kDa bis 2100 kDa). Der zweite Komplex III₂ Spot ist mit der Nummer 79 markiert und nach seiner Position in dem Gel kann er dem individuellen Komplex III₂ zugeordnet werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, liegt der Komplex III₂ stets als Homodimer in der Membran vor und hat eine Masse von ca. 480 kDa. In den Abbildungen Abbildung 12 Abbildung 13 sind Analysen der Menge der Core 2 Untereinheit in beiden Assemblierungsorganisationen dargestellt. Da es sich hierbei um das gleiche Protein handelt, können diese Proteinmengen über die analysierte Zeitspanne und in der Abhängigkeit von der Bestrahlung auch untereinander verglichen werden.

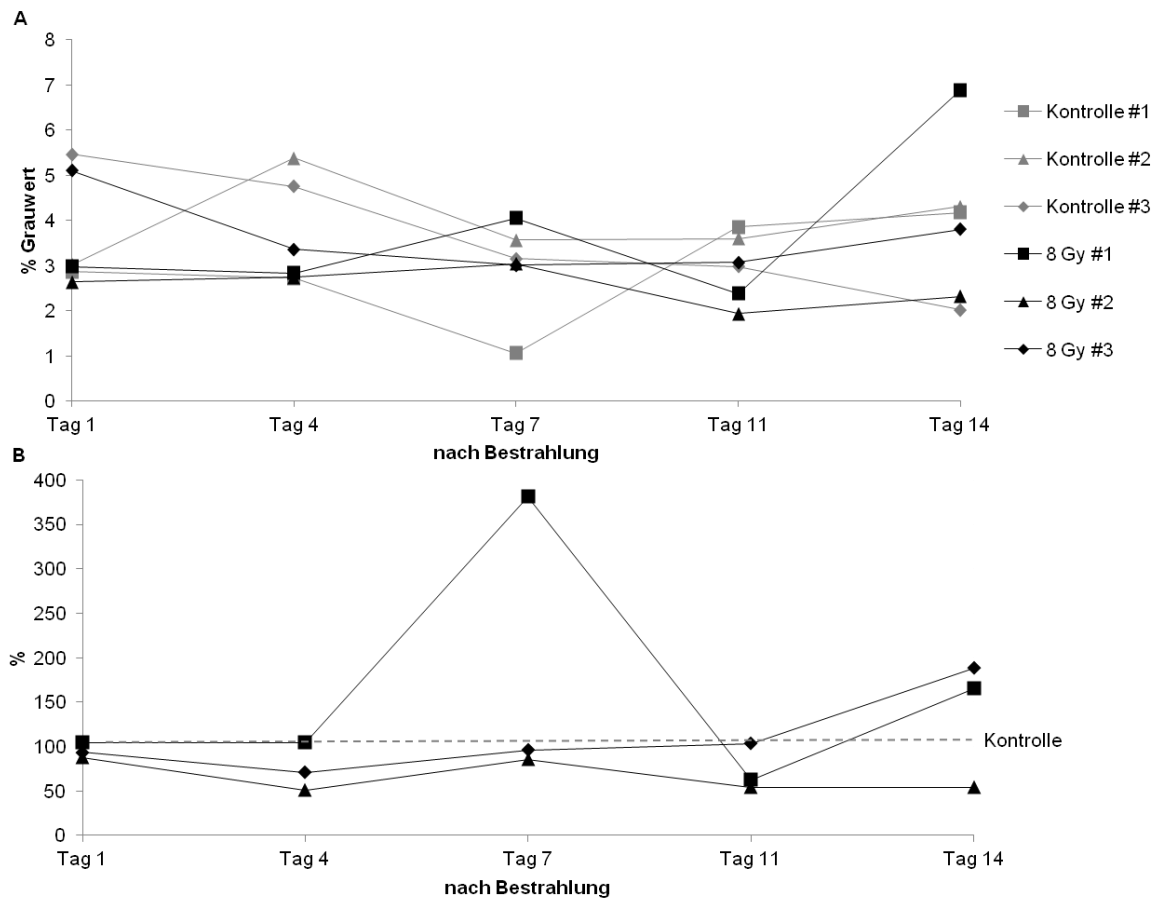


Abbildung 12: Relative Menge von Protein Core 2(Komplex III₂; Spot 82) in Superkomplexen in mitochondrialen Proben. Untersucht wurden Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen in einer Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung. Erläuterungen zur Diagrammbeschreibung sind der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen. Es können zu allen untersuchten Zeitpunkten keine eindeutigen Unterschiede in der Proteinmenge von Core 2 Untereinheit aus Superkomplexen zwischen unbestrahlten und bestrahlten mitochondrialen Proben festgestellt werden. Bei dem Replikate 1 der unbestrahlten Probe am Tag 7, sowie beim Replikate 1 der bestrahlten Probe am Tag 14 könnte es sich um Ausreißer handeln.

Die relative Menge der Core 2 Untereinheit des Komplexes III₂ aus Superkomplexen variiert in allen Proben unabhängig von der Strahlung zwischen ca. 2 % und ca. 5,5 % (siehe Abbildung 12). In Anbetracht der Ausübung von drei völlig unabhängigen Experimenten sind diese Variationen in der relativen Proteinmenge nicht negativ zu betrachten. Allerdings am Tag 7 weicht der Wert für das Replikate 1 der unbestrahlten Probe von den übrigen Werten deutlich ab und beträgt ca. 1%. Hierbei könnte es sich um einen Ausreißer handeln, da für die restlichen Proben am Tag 7 nach der Bestrahlung die relative Proteinmenge zwischen 3 % und 4 % ermittelt wurde. Das Gleiche kann bei dem Replikate 1 von bestrahlter Probe mit 8 Gy am Tag 14 nach Bestrahlung beobachtet werden. Hier beträgt die relative Proteinmenge für das superkomplexbildende Core 2 Protein ca. 7 %; während bei allen anderen Proben die Menge zwischen 2 % und 4,5 % liegt. Bei der Auswertung könnte sich

hier ein Farbbrest unter der Proteinfärbung versteckt haben, welcher nicht erkannt wurde. Selbiges könnte Erklärung für die starken Abweichungen einzelner Werte, auch bei anderen hier analysierten Proteinuntereinheiten, sein und rechtfertigt somit die Nichtberücksichtigung dieser bei der Interpretation der Daten.

Zusammengefasst kann man sagen, dass bei der superkomplexbildenden Core 2 Untereinheit keine Mengenunterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten mitochondrialen Proben bei allen Zeitpunkten der Analyse auftreten (siehe Abbildung 12 B).

In der Abbildung 13 ist die relative Proteinmenge von Core 2 Untereinheit im individuellen Komplex III₂, dargestellt.

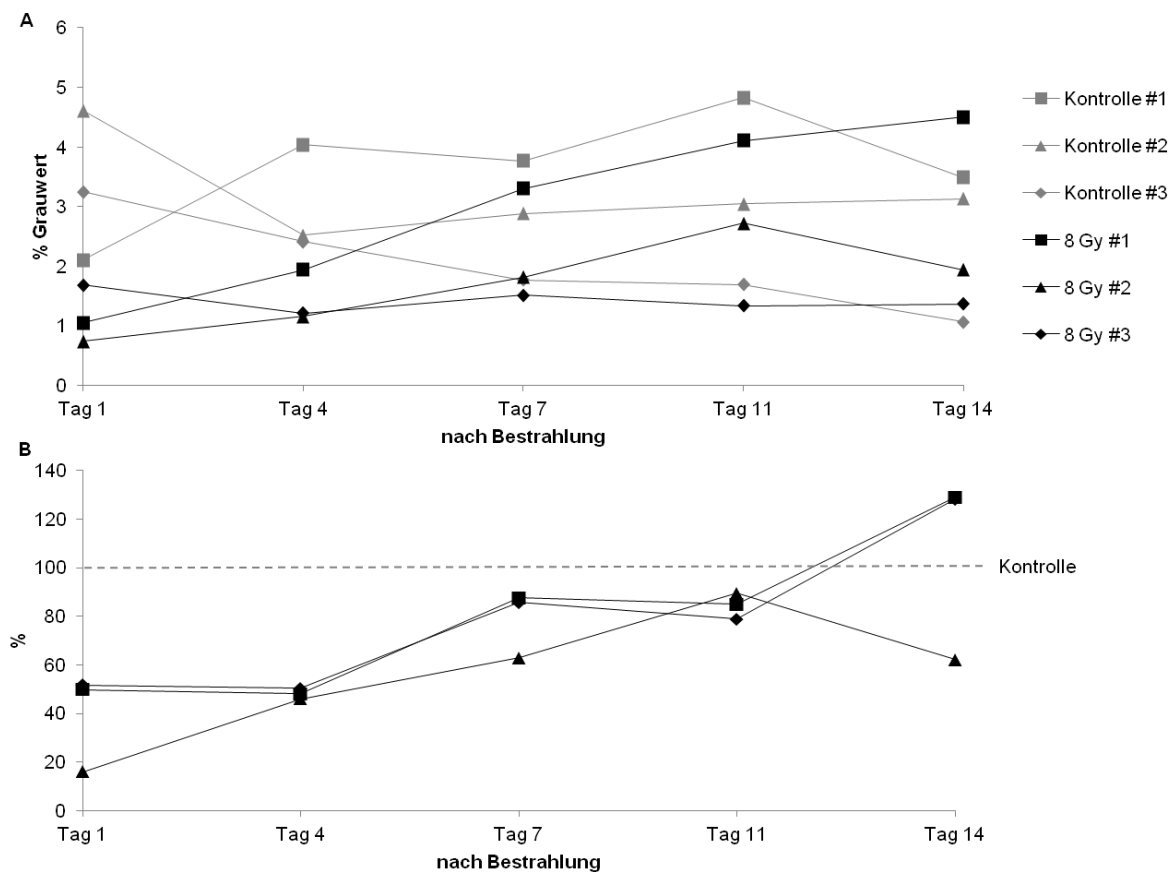


Abbildung 13: Relative Menge von Protein Core 2 aus individuellen Komplex III₂ (Spot 79) in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen untersucht in einer Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung. Erläuterungen zur Diagrammbeschreibung sind Abbildung 10 zu entnehmen. An Tag 1 bis 11 nach der Bestrahlung zeigen die Proben aus mit 8 Gy bestrahlten Zellen eine geringere Menge an dem Core 2 Protein aus individuellem Komplex III₂. Stärkste Abnahme, etwa 50 %, ist an Tag 1 und 4 zu sehen. Am Tag 14 können keine gemeinsamen Tendenzen bei den 3 Experimentdurchführungen, bezüglich dieses Proteins, zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben erkannt werden.

Die Proteinmenge von Core 2 aus individuellem Komplex III₂ ist nach der Bestrahlung, verglichen zur Kontrolle geringer (Tag 1 bis 11). Ab dem Tag 7 nach der Bestrahlung nimmt die ermittelte Core 2 (individuelle Komplex III₂) Proteinmenge in bestrahlten Proben zu, bis zum Tag 14, wo die Proteinmengen in bestrahlten und unbestrahlten Proben in etwa gleich sind. Am niedrigsten ist die Menge von Core 2 aus individuellem Komplex III₂ in isolierten Proben aus bestrahlten OLN-93 Zellen am Tag 1 nach der Bestrahlung. Die Abbildung 13 B zeigt deutlich, dass die Core 2 (individuelle Komplex III₂) Proteinmenge am Tag 1, wie auch am Tag 4 um Faktor 2, abhängig von der Bestrahlung reduziert wurde (ausgenommen Tag1 #2). Bei dem Replikat 2 am Tag 1 nach der Bestrahlung könnte es sich um einen Ausreißer handeln. In der Abbildung 13 A und B wird die bereits erwähnte Wichtigkeit der Betrachtung der Werte mit Bezug auf die Zusammengehörigkeit der Werte zu einer Experimentdurchführung deutlich. Die einzelnen Experimentbedingungen wurden stets gleich gehalten, dennoch sind Abweichungen bei den zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführten Bestrahlungen von Zellen, Isolierungen von Mitochondrien, und Solubilisierungen von Proteinen u.s.w. zu erwarten, wodurch technischen Fehler entstehen könnten.

Die relative Proteinmenge von Core 2 Untereinheit spiegelt die relative Menge von individuellem Komplex III₂ wieder, da diese Untereinheit für die Assemblierung von dem gesamten Komplex essentiell ist (Hosokawa et al., 1989). Hier könnte nach der Bestrahlung entweder ein Proteinabbau stattgefunden haben, oder der individuelle Komplex III₂ könnte in Superkomplexe assembliert worden sein. Die Abbildung 12 zeigt jedoch keine Zunahme der Menge des Komplexes III₂ in Superkomplexen nach der Bestrahlung, weshalb der Abbau des Proteins als mögliche Erklärung wahrscheinlicher ist. Vergleicht man die Abbildung 12 und Abbildung 13 weiter, erkennt man, dass die Menge des Core 2 Proteins in Superkomplexen sowohl für unbestrahlte, als auch für bestrahlte Proben im gleichen Bereich, zwischen 2,5 % und 5 %, liegt. Während bei individueller Komplex III₂ unbestrahlter Proben die ähnliche Proteinmenge gefunden wurde, fällt diese bei bestrahlten Proben auf Werte zwischen 0,7 % bis 1,7 %. Das bedeutet, dass vor der Bestrahlung vergleichbare Anteile von Komplex III₂ in Superkomplexen, wie in individueller Form vorliegen. Nach Bestrahlung wurde somit nur die Menge des individuellen Komplex III₂ reduziert.

Die Abnahme der relativen Menge von Core 2 Protein und somit auch des Komplexes III₂ ist noch deutlicher in der Abbildung 14 erkennbar. Hier ist die Gesamtmenge dieses Proteins dargestellt. Diese Werte wurden durch die Addition der in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellten einzelnen Werte ermittelt (Spot 79 und 82). Die eindeutige Abnahme der Gesamtmenge von Core 2 Protein ist in bestrahlten mitochondrialen Proben im Vergleich zu

unbestrahlten Proben an Tag 1, 4 und 11 nach der Bestrahlung erkennbar. Die stärksten Abnahmen sind jedoch direkt nach der Bestrahlung zu verzeichnen. Für spätere Zeitpunkte kann eine Annäherung der ermittelten Werte in bestrahlten und unbestrahlten Proben beobachtet werden, außer an Tag 14 wo keine gemeinsamen Tendenzen erkennbar sind.

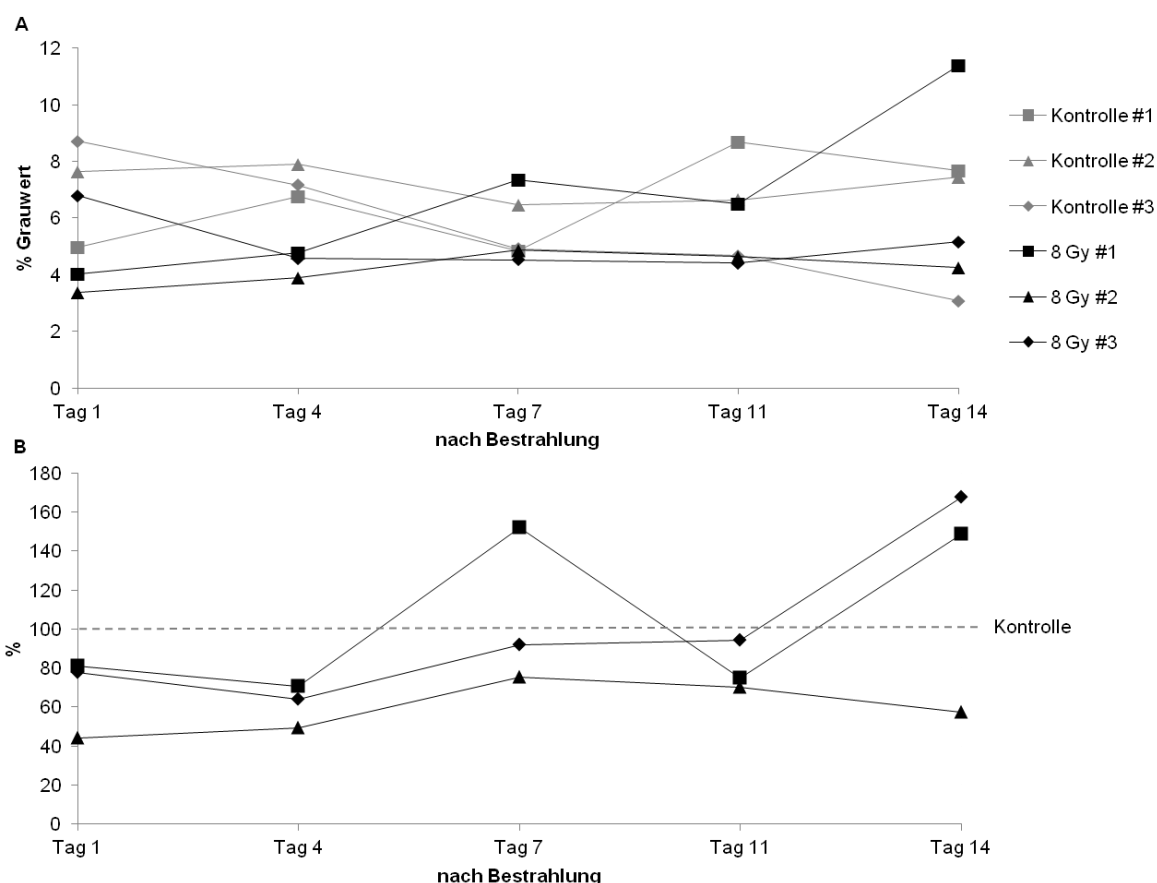


Abbildung 14: Relative Mengen von dem gesamten Core 2 Protein in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten und bestrahlten OLN-93 Zellen. Die dargestellten relativen Proteinmengen wurden durch die Addition der Werte der beiden Core 2 Spots (Spotnr. 82 und 79) errechnet. Dieses spiegelt relative Menge von dem Komplex III₂ in den mitochondrialen Proben wieder, da die Core 2 Untereinheit für die Assemblierung des Komplexes notwendig ist (Hosokawa et al., 1989). Beschreibung der Diagrammdarstellung wie in den Abbildung 10.

Die bereits vorgestellten Analysen über die Proteinmengen von drei Untereinheiten von Komplex I und III₂ aus Superkomplexen ermöglichen schon im Einzelnen grobe Abschätzungen der Menge von Superkomplexen in den Proben (siehe Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12). Allerdings erlauben diese Analysen keine eindeutige generelle Aussage über die relative Proteinmenge von in den Proben befindlichen Superkomplexen, da sie zum Teil unterschiedliche Veränderungen nach der Bestrahlung über die Zeit zeigen. Während die relative Menge von Komplex I NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit aus Superkomplexen nach der Bestrahlung erst

abnimmt und anschließend zunimmt, bleibt die relative Menge von NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Untereinheit 9 und von Core 2 Untereinheit vom Komplex III₂ aus Superkomplexen unverändert. Genauer kann die Menge von Superkomplexen durch das Betrachten der gesamten Proteinmenge aller Untereinheiten aus Superkomplexen analysiert werden. In der Abbildung 15 ist durch die Addition der Werte aller superkomplexbildenden Spots (Spot 34/35, 82, 102) die ermittelte relative Menge von Superkomplexen in mitochondrialen Proben aus bestrahlten und unbestrahlten OLN-93 Zellen dargestellt.

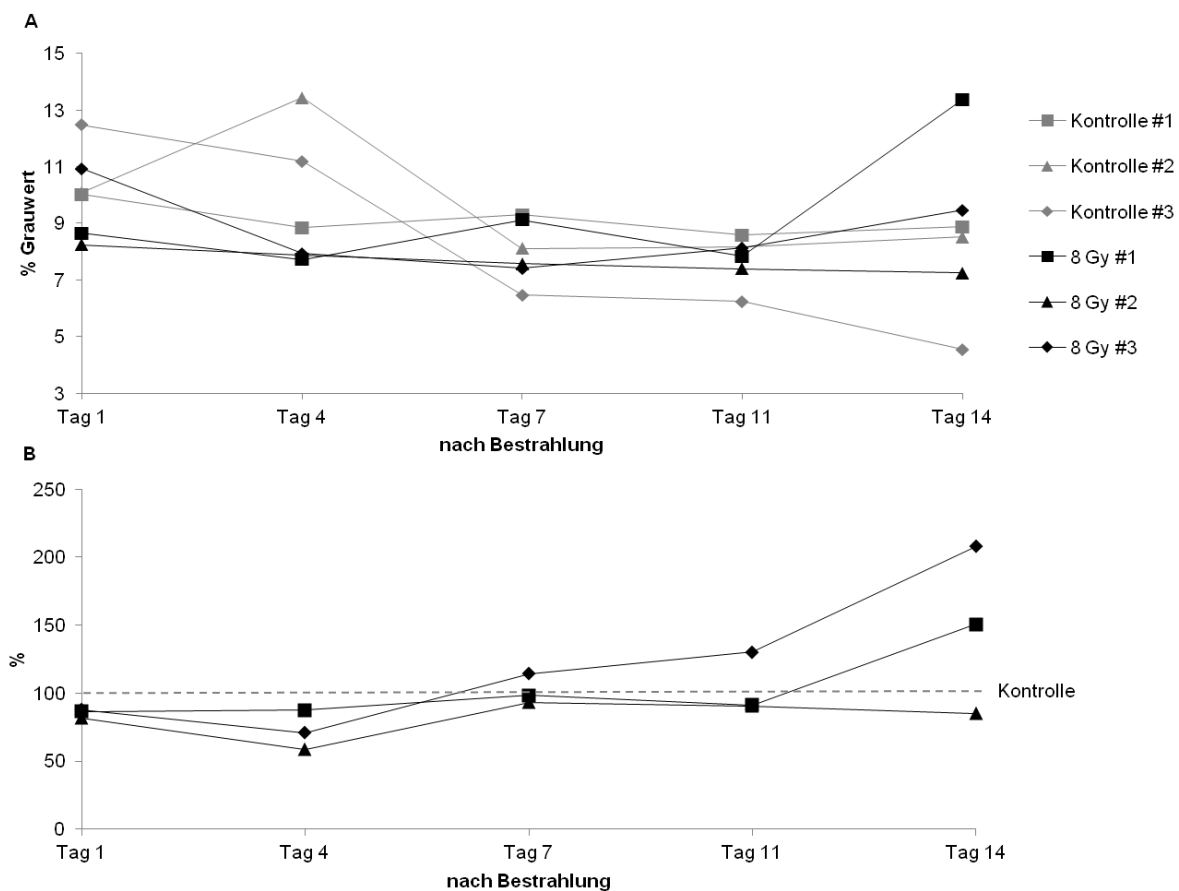


Abbildung 15: Relative Menge von Superkomplexen in den mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen. Die dargestellten Werte repräsentieren die Summe der Proteinmengen von (Spots 34/35, 82 und 102) NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit (Komplex I), NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex Untereinheit 9 (Komplex I) und Core 2 Untereinheit aus Superkomplexen (Komplexes III₂). Die Menge der Superkomplexe nimmt an Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung ab. An Tag 7 und 11 nach der Bestrahlung ist die Menge von Superkomplexen in unbestrahlten und bestrahlten Proben ähnlich. Am Tag 14 streuen die Werte sowohl für die unbestrahlten, als auch für die bestrahlten Proben sehr stark.

Es ist nun wichtig zu betonen, dass sich die ermittelten Mengen auf alle Komplexe I und III₂ beinhaltenden Superkomplexe beziehen. Dazu zählen die Superkomplexe I₁III₂IV₀₋₃, aber auch andere, bislang unbekannte Assemblierungskombinationen, wie z. B. I₁III₂IV_{n>3}, I₁

(III₂)_nIV₀₋₃ usw. sind möglich. Es zeigt sich eine Abnahme in der relativen Menge von Superkomplexen in den ersten vier Tagen nach der Bestrahlung. Die Abnahmen sind vor allem am Tag 4 eindeutig zu erkennen. Betrachtet man die Werte des einen Experimentdurchlaufs untereinander, so kann dieses auch am Tag 1 nach der Bestrahlung beobachtet werden (siehe Abbildung 15 B). An den Tagen 7 und 11 nach der Bestrahlung können keine strahlungsinduzierten Unterschiede in der relativen Superkomplexmenge beobachtet werden. Die stark streuenden Werte am Tag 14 nach der Bestrahlung liefern keine Hinweise über die strahlungsinduzierten Veränderungen in der Proteinmenge von Superkomplexen in den Proben.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die ionisierende Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Röntgenstrahlung) einen Effekt auf die Menge der oben vorgestellten Proteinuntereinheiten der Komplexe I und III₂ hat. Daher lässt sich vermuten, dass die Menge von den gesamten Komplexen I und III₂ ähnlich beeinflusst werden. Ferner kann daraus geschlossen werden, dass die strahlungsinduzierten Effekte auf die Proteinmengen sowohl für das individuelle Komplex III₂, als auch für die Superkomplexe zu beobachten sind. Bei den meisten vorgestellten Ergebnissen sieht man die stärksten Unterschiede (Abnahmen) nach der Bestrahlung an Tag 1 und 4.

Die meisten Proteinspots, die der Atmungskette zugeordnet werden konnten, sind die Untereinheiten des Komplexes V (siehe Abbildung 9). Komplex V ist ein ca. 750 kDa schwerer membranständiger Proteinkomplex aus zwei Segmenten: Der F₁-Kopfteil, an dem die ATP-Synthese abläuft, ragt in den Matrixraum hinein, während der F₀-Teil in die innere Mitochondrienmembran integriert ist und für die Translokation von Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix zuständig ist. Nach motorischen Funktionen kann der Komplex V in ein Rotor- und ein Statorsegment unterteilt werden. Komplex V liegt in der inneren mitochondrialen Membran als Monomer oder als Oligomer vor (Frenzel et al., 2010; Giraud et al., 2002; Krause et al., 2005; Schagger and Pfeiffer, 2000). Die Assemblierung von Komplex V mit Komplexen I, II, III, und IV der Atmungskette ist bis heute nicht beobachtet worden.

Im Folgenden werden die relativen Mengen von Komplex V Untereinheiten, welche in den 2D BN/SDS Gelen zugeordnet werden konnten, dargestellt. In den OLN-93 mitochondrialen Proben können die Untereinheiten des Komplexes V aus monomeren und dimeren Formen detektiert werden. Die größten Untereinheiten dieses Komplexes stellen α und β Untereinheiten dar, welche in SYPRO-Ruby gefärbten 2D BN/SDS Gelen die dominantesten

Spots sind. Drei α und drei β Untereinheiten bilden den F_1 -Kopfteil bzw. das Statorsegment des Komplexes V.

In Abbildung 16 ist die Relativabundanz der α Untereinheit des Komplex V-Monomer veranschaulicht.

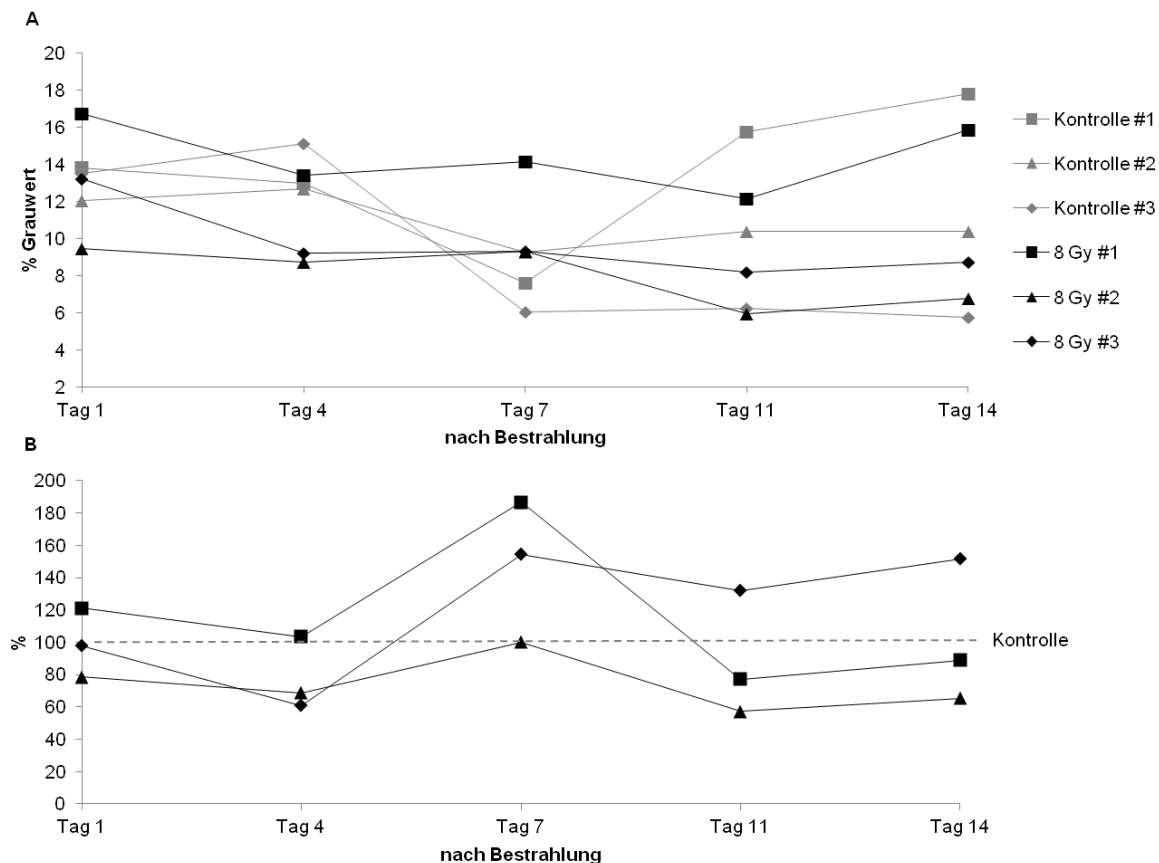


Abbildung 16: Relative Menge der α Untereinheit im Komplex V Monomer (Spot Nr. 55/57) in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung. In den Proben variiert die relative Proteinmenge der α Untereinheit vom Komplex V Monomer unabhängig von der Bestrahlung über die Zeit zwischen ca. 6 % und 18 % in den Proben. Demnach sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen einzelnen Proben erkennbar.

Aus der Analyse der relativen Mengen der α Untereinheit vom Komplex V Monomer (siehe Abbildung 16) lassen sich zu allen untersuchten Zeitpunkten keine strahlungsabhängigen Veränderungen in bestrahlten Proben erkennen. Der Einfluss von, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, durchgeführten Experimenten macht sich hier besonders stark bemerkbar. Die Replikate (unterschiedliche Experimentdurchführungen) der einen Probe streuen stark voneinander, ausgenommen der unbestrahlten (Kontrolle) Proben an Tag 1, 4 und 7. An Tag 1 nach der Bestrahlung liegt die relative Menge der α Untereinheit von Komplex V Monomer in Kontrollproben zwischen ca. 12 % und 14 % bzw. in bestrahlten zwischen ca. 9 % und

17 %. Somit ergibt sich am Tag 1 kein Unterschied zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben. Am Tag 4 nach der Bestrahlung ändert sich die relative Menge der α Untereinheit Komplex V Monomer in unbestrahlten Proben kaum. Dagegen ist die Menge dieses Proteins in bestrahlten Proben zwischen Tag 1 und 4 etwas gesunken und liegt zwischen ca. 8 % und 13 %. Diese Werte ändern sich kaum am Tag 7 nach der Bestrahlung, während sie in den unbestrahlten Proben in den Bereich zwischen ca. 6 % und 9 % absinken. An Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung gehen die Werte bei beiden Proben sehr stark auseinander.

Zusammengefasst sind keine eindeutigen Unterschiede in der Abundanz der α Untereinheit im Komplex V Monomer in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung mit 8 Gy erkennbar. Selbst unter Betrachtung der Proben im Hinblick auf die Zugehörigkeit zu einem Experimentdurchlauf, ergeben sich zu allen Untersuchungszeitpunkten keine verändernden Tendenzen in der Abundanz von α Untereinheit im Komplex V Monomer (siehe Abbildung 16 B).

Die relativen Mengen der α Untereinheit im Komplex V Dimer in Abhängigkeit von der Bestrahlung sind in der Abbildung 17 gezeigt. Der ausgewertete Spot ist in der Abbildung 9 mit der Nummer 56/58 markiert.

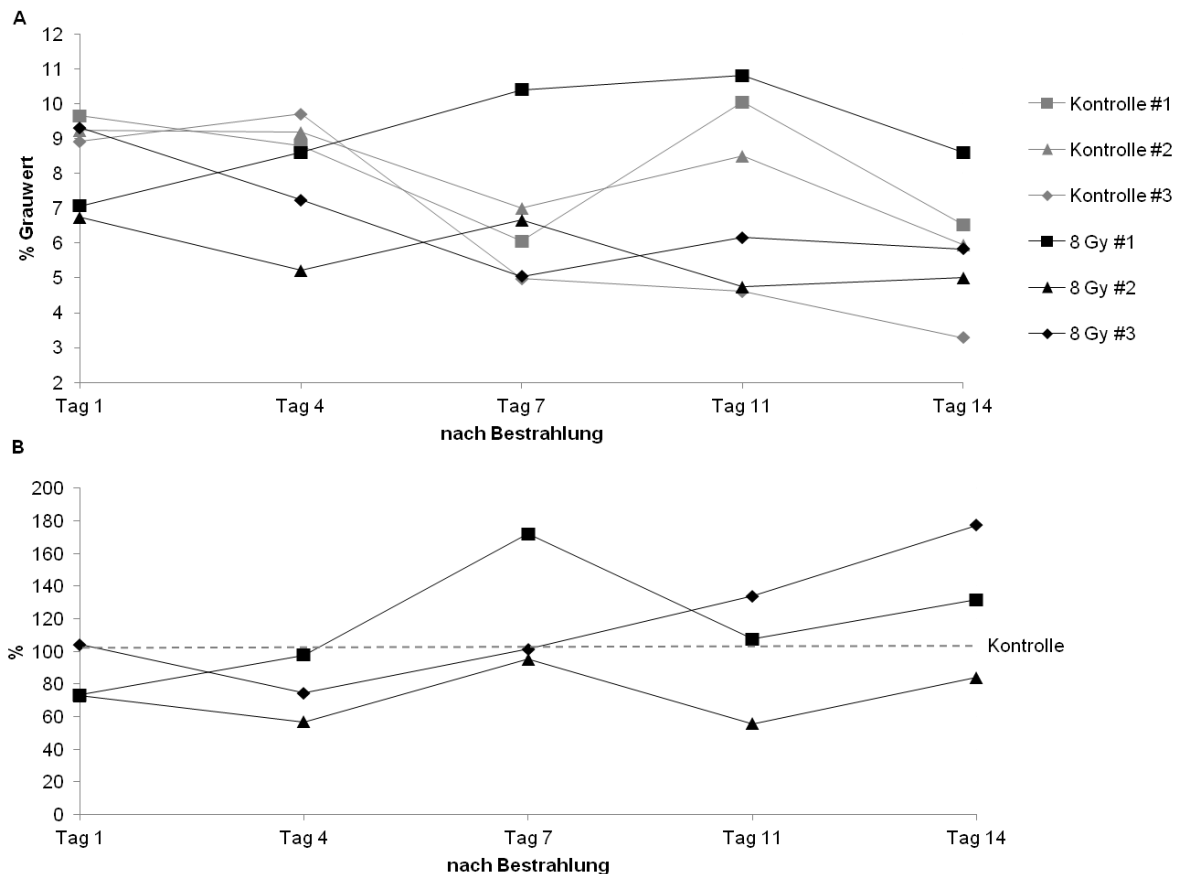


Abbildung 17: Relativabundanz der α Untereinheit im Komplex V Dimer (Spot 56/58) in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy. Die Diagrammerläuterung ist der Abbildung 10 zu entnehmen. Die Werte der einzelnen Replikate variieren stark, besonders bei bestrahlten Proben. Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Bestrahlung sind keine eindeutigen Unterschiede erkennbar, wobei es an Tag 1 und 4 Hinweise auf eine leichte Abnahme in der Proteinabundanz in bestrahlten, verglichen zu unbestrahlten, Proben gibt.

Die relative Menge der α Untereinheit im Komplex V Dimer liegt in allen Proben zwischen ca. 3 % und 11 %. Besonders stark variieren die Werte an Tag 7, 11 und 14. Selbst unter Berücksichtigung der unabhängigen Experimentdurchführungen sind diese Abweichungen unerwartet hoch. Somit sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben erkennbar. Allerdings zeichnet sich an Tag 4 nach der Bestrahlung eine leichte Abnahme der Proteinmenge ab. Schließt man den #3 Wert der bestrahlten Probe aus, so lässt sich an Tag 1 nach der Bestrahlung ebenfalls eine leichte Abnahme beobachten. Die geringe Anzahl (drei) an durchgeführten Wiederholungen lässt keine statistisch relevanten Aussagen zu. Dennoch kann eine tendenzielle Abnahme von α Untereinheit im Komplex V Dimer in den Zellen direkt nach der Bestrahlung mit 8 Gy (Tag 1 und 4) aufgezeigt werden.

Die gesamte relative Menge der α Untereinheit des Komplexes V kann durch Addition der Werte aus Monomer und Dimer (Spot 55/57 und 56/58) ermittelt werden. Dies ist in der Abbildung 18 dargestellt.

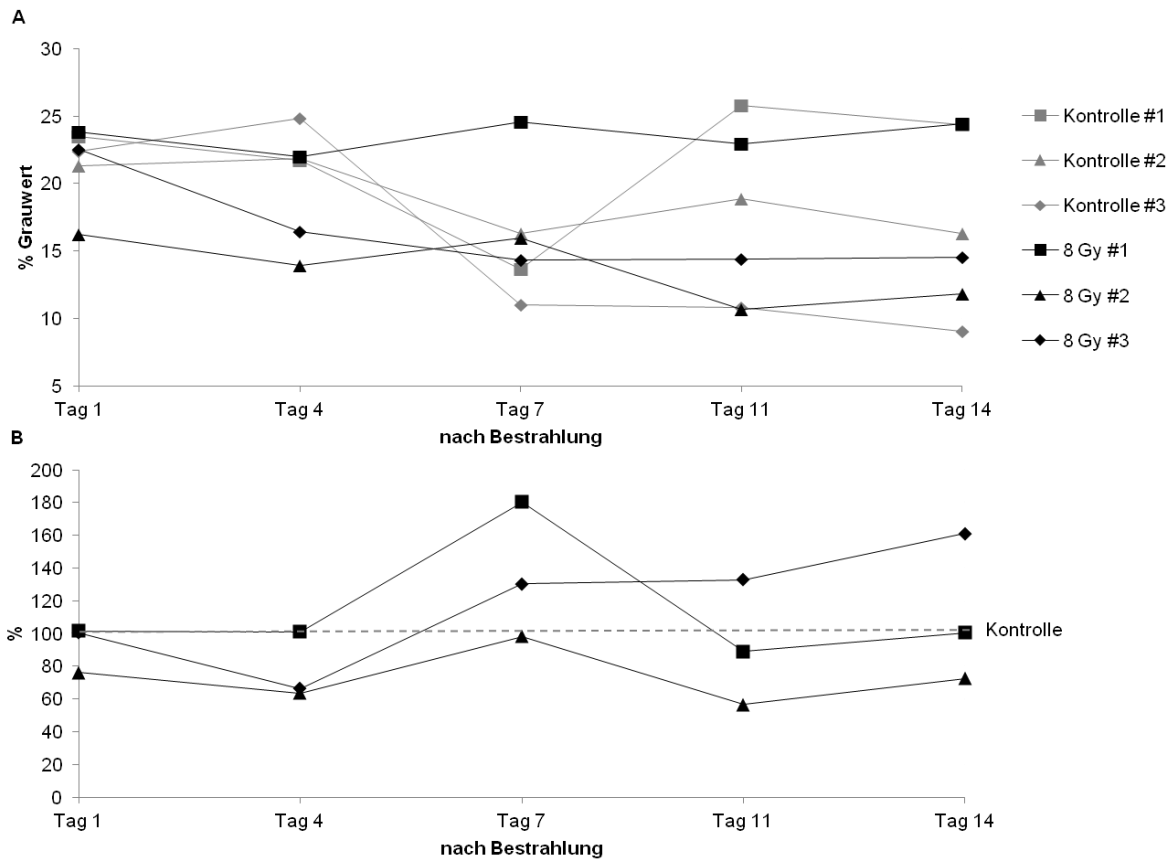


Abbildung 18: Relative Abundanz der α Untereinheit des Komplexes V in Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und mit Röntgenstrahlen bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen zusammengefasst. % Grauwerte von Spots 55/57 und 56/58 wurden zusammenaddiert. Relative Proteinmenge von α Untereinheit schwankt in Proben zwischen ca. 10 % und 26 %. Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Auch hier unterscheiden sich die einzelnen Werte stark. Die gesamte relative Abundanz von der α Untereinheit liegt im Bereich zwischen ca. 9 % und 26 % in allen untersuchten Proben. Allerdings zeigen die Replikate der unbestrahlten Probe (Kontrolle) an Tag 1, 4 und 7 nach der Bestrahlung eine gute Übereinstimmung. Die Werte der bestrahlten Proben (8 Gy) unterscheiden sich zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Bestrahlung stark. Ein eindeutiger Unterschied zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben in der Menge der α Untereinheit des Komplexes V ist auch hier nicht erkennbar. Schließt man den #1 Wert der bestrahlten Probe aus der Interpretation aus, so ergibt sich an Tag 4 nach der Bestrahlung tendenziell eine Abnahme in der Proteinabundanz der α Untereinheit.

Auf dem 2D BN/SDS Gel sind die Proteinspots der α und β Untereinheit des Komplexes V in mitochondrialen Proben aus den meisten Organismen, den meisten Geweben, sowie aus den meisten in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Zelllinien am dominantesten. Dasselbe kann auch bei den mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Die β Untereinheit des Komplexes V kann anders als α Untereinheit in drei verschiedenen Spots (siehe Abbildung 9) detektiert werden. Neben den β Untereinheiten, stammend aus monomerer und dimerer Form des Komplexes V, kann diese auch aus freiem F_1 Kopfteil analysiert werden.

Die α und β Untereinheiten bilden den F_1 Kopfteil des Komplexes V, indem sie sich in einer abwechselnden Anordnung zu einer $3\alpha\beta$ -Struktur anordnen (Abrahams et al., 1994). Somit ist die gleiche Menge von beiden Untereinheiten in den Proben zu erwarten. Die beiden Untereinheiten sind stark homolog zueinander (Abrahams et al., 1994; Walker et al., 1982), weshalb auch ein ähnliches Färbeverhalten von beiden Proteinen bei der Anwendung von, für die Quantifizierung, geeigneten Farbstoffen wie SYPRO Ruby, angenommen werden kann. Aus diesem Grund können die relativen Mengen von α und β Untereinheiten untereinander analysiert werden und es ist zu erwarten, dass sie in etwa gleicher Menge in den Proben vorhanden sind.

Die relative Menge der β Untereinheit in dem Komplex V Monomer ist in der Abbildung 19 ersichtlich. Die relative Menge der β Untereinheit im Komplex V Monomer liegt bei allen Proben im Bereich zwischen 7 % und 21 %. Die Auswertung der relativen Abundanz zeigt keine eindeutigen Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten mitochondrialen Proben an Tag 1, 4 und 7. Die Darstellung der Werte von bestrahlten Proben im Verhältnis zu entsprechenden Kontrollwerten (siehe Abbildung 19 B) lassen an Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung deutliche Abnahmen der Proteinmenge erkennen.

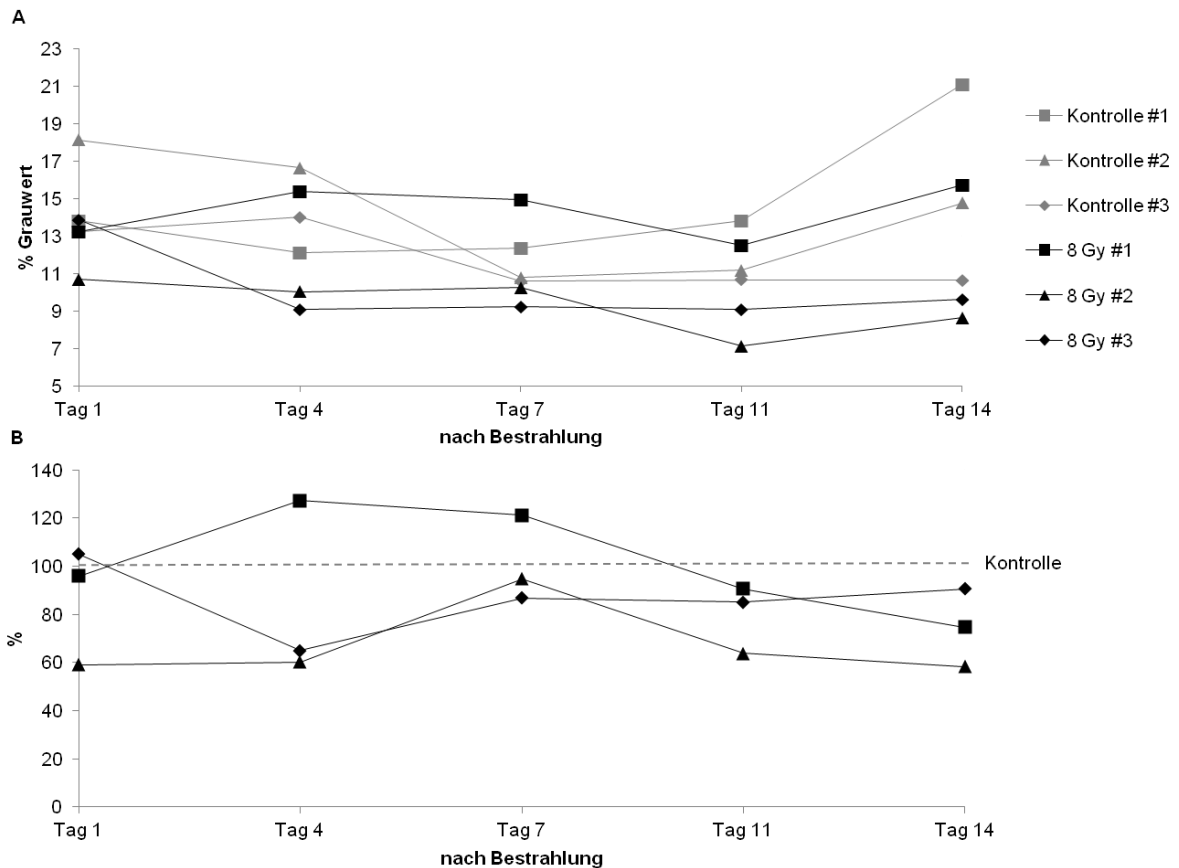


Abbildung 19: Relative Menge der β Untereinheit aus Komplex V Monomer (Spot 63/66) in mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (8 Gy) im Vergleich zu unbestrahlten Proben (Kontrolle). Relative Menge der β Untereinheit aus Komplex V Monomer liegt bei allen Proben zwischen ca. 7 % und 21 %. An Tag 1, 4 und 7 nach der Bestrahlung können keine Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben festgestellt werden. Im Bezug auf die Zusammengehörigkeit der Werte zu einer Experimentdurchführung (siehe B) lassen sich die strahlungsabhängigen Abnahmen an Tag 11 und 14 erkennen.

Im Vergleich zu den in Abbildung 16 gezeigten Ergebnissen für die α Untereinheit aus dem Komplex V Monomer, zeigen sich die Werte für die β Untereinheit etwas erhöht. Dennoch korrelieren die Mengen der beiden Proteine in dem Komplex V Monomer gut. So zum Beispiel liegt an Tag 1 nach Bestrahlung die relative Menge von der α Untereinheit in unbestrahlten (Kontrolle) Proben bei 12 % bis 14 %, während bei der gleichen Probe der β Untereinheitsanteil im Bereich zwischen 13 % und 18 % ist. Die mögliche Erklärung für diese kleinen Unterschiede könnten die Differenzen in der Aminosäuren-Zusammensetzung der beiden Proteine und somit auch in der Färbeintensität sein.

Die relative Menge der β Untereinheit aus Komplex V Dimer (Spot 64) ist in der Abbildung 20 dargestellt.

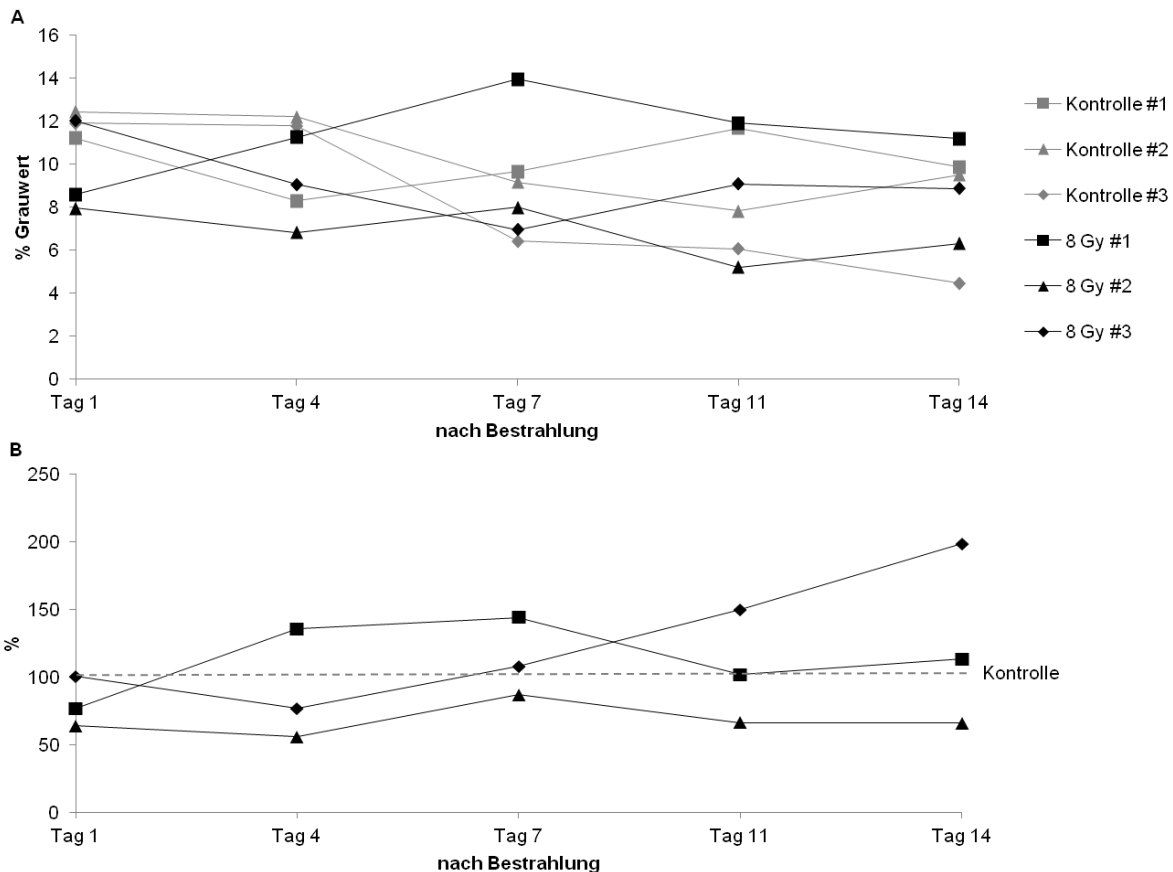


Abbildung 20: Relative Menge der β Untereinheit vom Komplex V Dimer in Mitochondrien, isoliert aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung. Densitometrisch ausgewertet ist der Spot 64 im Verhältnis zu allen Proteinen auf dem Gel. Zwischen beiden Probegruppen können keine Unterschiede bezüglich der Menge der β Untereinheit aus Komplex V Dimer nachgewiesen werden. Die Werte liegen bei allen Proben im Bereich zwischen 5 % und 14 %.

Zu allen analysierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung können keine Unterschiede zwischen mitochondrialen Proben aus unbestrahlten und bestrahlten OLN-93 Zellen bezüglich der relativen Abundanz der β Untereinheit aus Komplex V Dimer gesehen werden. Die ermittelten Werte variieren stark im Bereich zwischen 4 % und 14 %. Dennoch ist eine Abhängigkeit zu der Bestrahlung, oder dem Zeitpunkt der Isolierung der Mitochondrien aus den Zellen nicht gegeben. Vergleicht man diese Werte mit Ergebnissen für die α Untereinheit aus Komplex V Dimer (siehe Abbildung 17), so stellt man fest, dass auch hier die erwartete gleiche Menge von α und β Untereinheiten gegeben ist. Die relative Menge der α Untereinheit aus Komplex V Dimer liegt zwischen ca. 3 % und 11 % und ist somit in gleichem Maße in den Proben vorhanden, wie die β Untereinheit.

Wie bereits erwähnt, findet man in 2D BN/SDS Gelen der mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen neben den β Untereinheiten aus Komplex V Monomer und Dimer noch einen weiteren Spot, der mittels PMF als β Untereinheit identifiziert werden konnte. Die Position

dieses Proteinspots im 2D Gel unter der BN-Spur lässt schließen, dass diese β Untereinheit aus dem freien F_1 -Kopfteil des Komplexes V stammt (siehe Abbildung 9). Der F_1 Kopfteil hat eine Masse von ca. 450 kDa. Der freie F_1 -Kopfteil ist enzymatisch aktiv und kann durch die Hydrolyse von ATP den Energiehaushalt der Zelle beeinträchtigen. Die Produktion von ATP ist durch den F_1 -Kopfteil nicht möglich, da das elektrochemische Potential als Antriebskraft nicht genutzt werden kann. Das Auftreten von dem freien F_1 -Kopfteil in den Mitochondrien bzw. Zellen wurde schon in einem Zusammenhang mit mitochondrialen Dysfunktionen diskutiert (Wittig et al., 2006). Weiterhin wurde der zunehmende Anteil an freiem F_1 -Kopfteil im Zusammenhang mit dem Alterungsprozess beschrieben (Frenzel et al., 2010; Thilmany, 2013).

In der Abbildung 21 ist die relative Abundanz der β Untereinheit aus dem freien F_1 Kopfteil in den untersuchten Proben dargestellt. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in 2D Gelen der untersuchten Proben keine α Untereinheit aus dem freien F_1 Kopfteil detektiert werden konnte. Wie bereits bei obigen Auswertungen von α und β Untereinheiten ersichtlich war, scheint die α Untereinheit eine etwas schwächere Färbeintensität mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby aufzuweisen. Mögliche Erklärung für das Fehlen des Spots für die α Untereinheit aus dem freien F_1 -Kopfteil in 2D Gelen könnte eine zu geringe Menge des Proteins sein, die unterhalb der Nachweisgrenze des Farbstoffes liegt.

Der Anteil der β Untereinheit aus dem freien F_1 -Kopfteil ist deutlich kleiner, als deren Anteil im Komplex V Monomer (7 % bis 21 %) und Dimer (4 % bis 14 %) und liegt gerade bei 1 % bis 6 %. In Anbetracht der Zusammengehörigkeit der Werte zu einem Experiment sind an Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung, verglichen zur Kontrolle, die Abnahmen der relativen Menge dieser Untereinheit zu erkennen (siehe Abbildung 21 B). Zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung sind keine eindeutigen Unterschiede zu sehen. Allerdings sei erwähnt, dass an Tag 7 und 11 zwei von drei Werten der bestrahlten Proben die Erhöhungen, verglichen zu entsprechenden Kontrollen, aufweisen, während sich jeweils ein Wert ähnlich wie die zugehörige Kontrolle verhält. Eine Zunahme in der Menge von der β Untereinheit aus dem freien F_1 -Kopfteil könnte als ein Indiz für die strahlungsinduzierte mitochondriale Dysfunktion sein. Jedoch kann dieses anhand der Daten nicht zweifelsfrei belegt werden.

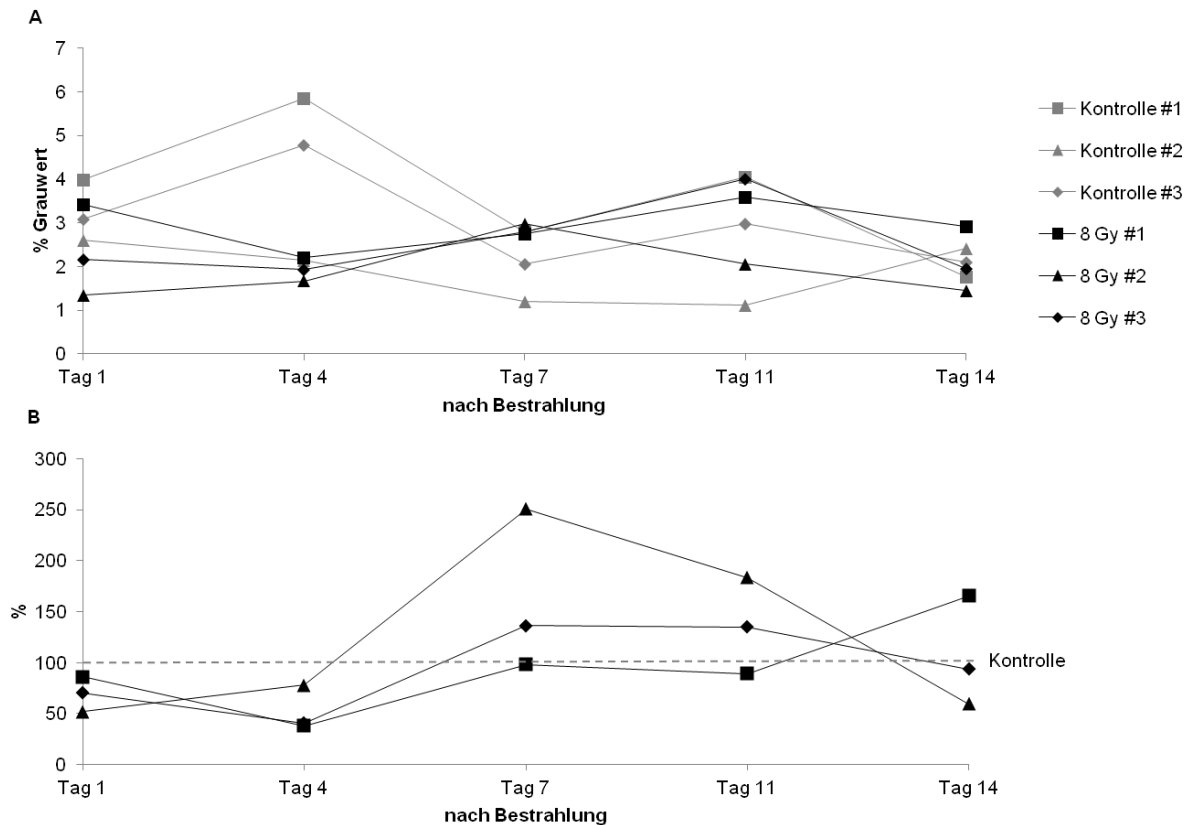


Abbildung 21: Relative Menge der β Untereinheit aus dem freien F_1 -Teil des Komplexes V in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen in einer Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung. Werte ergeben sich aus densitometrischer Analyse des Spots 62. In allen Proben verteilen sich die Werte in einem Bereich zwischen ca. 1 % und 6 %. An Tag 1 und 4 kann die Reduzierung der Abundanz der β Untereinheit aus dem freien F_1 -Teil in Abhängigkeit von Bestrahlung gesehen werden. Genauere Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Die Existenz von dem freien F_1 Kopfteil in unbestrahlten und bestrahlten OLN-93 Zellen ist hiermit nachgewiesen. Hierbei ist nicht klar, ob es sich dabei um rekrutierte F_1 -Kopfteile handelt, die für die Assemblierung des Komplexes V von der Zelle bereitgestellt wurden, oder ob es sich dabei um von Komplex V dissoziierte Teile handelt. Der eindeutige Effekt von Bestrahlung auf die Menge von dem freien F_1 -Kopfteil kann nur unter Betrachtung von Werten in einem prozentualen Verhältnis zu den zusammengehörigen Kontrollen an Tag 1 und 4 beobachtet werden (siehe Abbildung 21 B).

Durch die Auswertung von einzelnen Spots für die β Untereinheit können die Unterschiede in der relativen Abundanz der β Untereinheit aus dem freien F_1 -Kopfteil direkt nach der Bestrahlung (Tag 1 und 4), sowie aus Komplex V Monomer an Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung in den Proben erkannt werden. Der Effekt ionisierender Strahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Röntgenstrahlung) auf die Gesamtmenge der β Untereinheit ist in der Abbildung 22 dargestellt. Die Gesamtheit der relativen Abundanz der β Untereinheit lässt

sich durch Addition von Werten für die Untereinheit aus Komplex V Dimer und Monomer, sowie aus dem freien F₁-Kopfteil errechnen. Durch das Aufaddieren könnten mögliche kleinere Unterschiede, die in der einzelnen Spotauswertung nicht ersichtlich waren, erkennbar werden.

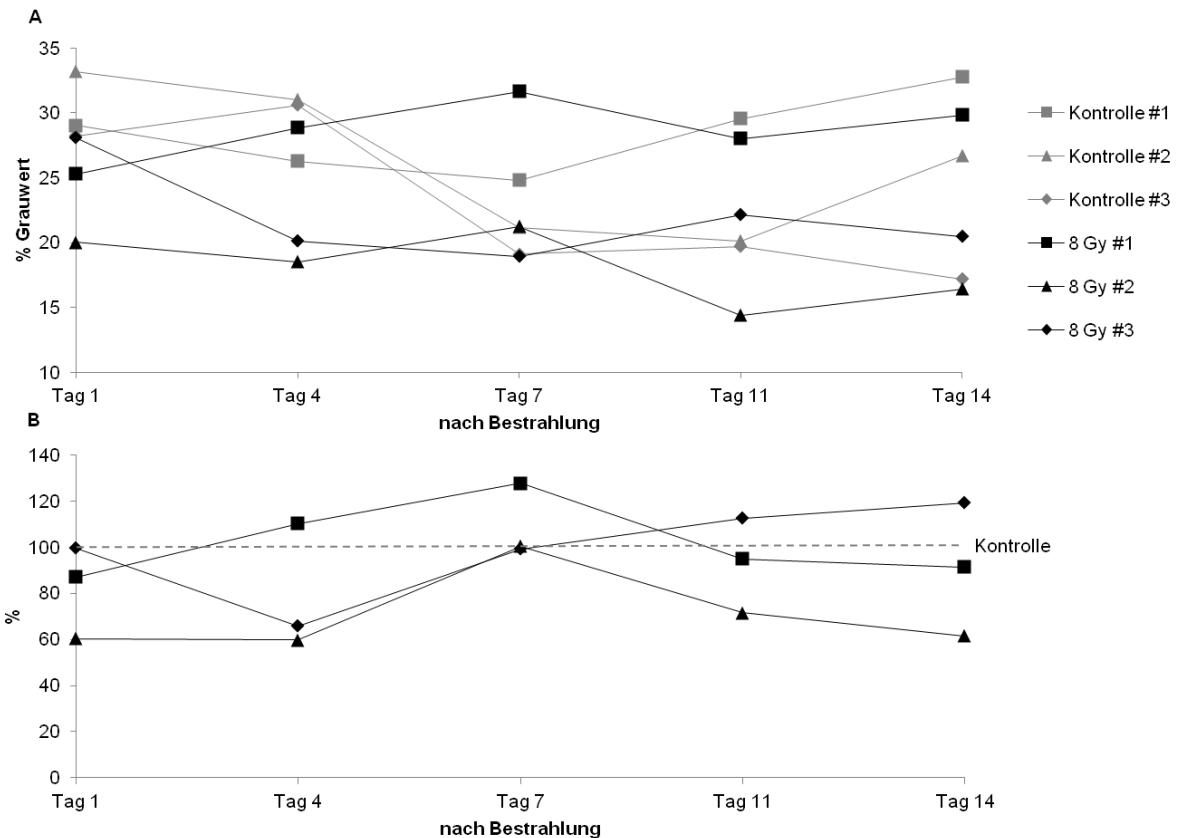


Abbildung 22: Relative Menge von allen detektierten β Untereinheiten von Komplex V in mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlung. Untersucht wurden Proben, isoliert aus unbestrahlten (Kontrolle) und mit 8 Gy bestrahlten Zellen an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach Bestrahlung. Die Summe der einzelnen densitometrischen Auswertungen für die 3 β Untereinheiten (Spotnummer: 62, 63/66 und 64,) stellt die relative Gesamtmenge dar. An Tag 1 nach der Bestrahlung tritt eine Abnahme der Menge von β Untereinheit für #1 und #2 auf. Die Werte für #3 der unbestrahlten und bestrahlten mitochondrialen Proben sind an Tag 1 nach der Bestrahlung in etwa gleich. Zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung können keine Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben detektiert werden.

Die gesamte Abundanz von der β Untereinheit in allen untersuchten mitochondrialen Proben liegt im Bereich zwischen ca. 14 % und 34 %. Betrachtet man einzelne Replikate über die Zeit, so weichen die Werte in derselben weniger voneinander ab. So z. B. variieren bei den unbestrahlten Proben die Werte der relativen Abundanz der β Untereinheit für das Replikat 1 in der untersuchten Zeitspanne zwischen ca. 25 % und 33 %. Das Replikat 1 der Proben aus mit 8 Gy bestrahlten OLN-93 Zellen liegt im gleichen Bereich. Die niedrigste relative Menge der β Untereinheit (14 %) ist bei dem Replikat 2 an Tag 11 nach der Bestrahlung

aufzufinden, wobei bei dieser Probe die maximale Menge an Tag 7 nach der Bestrahlung deutlich niedriger (ca. 21 %) ist, als bei den restlichen Proben. Eine Abhängigkeit von der Bestrahlung oder von dem Zeitpunkt der Isolation von Mitochondrien ist nicht eindeutig erkennbar. Da die Anzahl der Replikate mit nur drei sehr klein ist, kann eine statistisch relevante Aussage nicht getroffen werden. Eine strahlungsinduzierte Abnahme könnte an Tag 1 nach der Bestrahlung gegeben sein. Dieses müsste aber mit weiteren Experimenten noch verifiziert werden. Zu dem Zeitpunkt zeigen die Replikate 1 und 2 eine 5 % bis 15 %-ige Abnahme an der Proteinmenge nach der Bestrahlung. Beide Replikate 3 von bestrahlten und unbestrahlten Proben zeigen in etwa die gleiche Menge (ca. 28 %) an der β Untereinheit aus dem Komplex V zum gleichen Zeitpunkt.

Die Daten für die relativen Mengen der gesamten β Untereinheit (siehe Abbildung 22) können nicht direkt mit den Werten der gesamten α Untereinheiten (siehe Abbildung 18) der Proben verglichen werden, da bei der α Untereinheit nur die zum Komplex V Monomer und Dimer gehörigen Spots detektiert und analysiert worden sind, während bei der β Untereinheit zusätzlich noch der Spot aus dem freien F_1 -Kopfteil detektiert und analysiert werden konnte.

Da α und β Untereinheiten unabhängig vom Vorkommen im Komplex V Monomer oder Dimer im Verhältnis 1:1 vorliegen und da sie bei allen Proben als die dominantesten Spots in den Gelen detektierbar sind, können durch das Aufaddieren von relativen Mengen dieser beiden Untereinheiten die relativen Mengen von Komplex V Monomer und Dimer errechnet werden. Die Summen von jeweiligen α - und β -Untereinheiten sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 graphisch dargestellt.

Die Auswertung der relativen Menge vom Komplex V Monomer (siehe Abbildung 23) zeigt, ähnlich wie die Analysen der einzelnen Spots für die α und β Untereinheit, keine eindeutige Wirkung von ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung) mit einer Dosis von 8 Gy auf die Zellen. An Tag 1 bis 7 nach der Bestrahlung liegen die ermittelten Werte der Proteinmenge im Bereich zwischen ca. 16 % und 30 % bei allen untersuchten Proben relativ dicht beieinander. Deutlich stärker variieren die Werte an Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung, wo die relative Menge vom Komplex V Monomer in den Proben im Bereich zwischen 13 % und 39 % liegt.

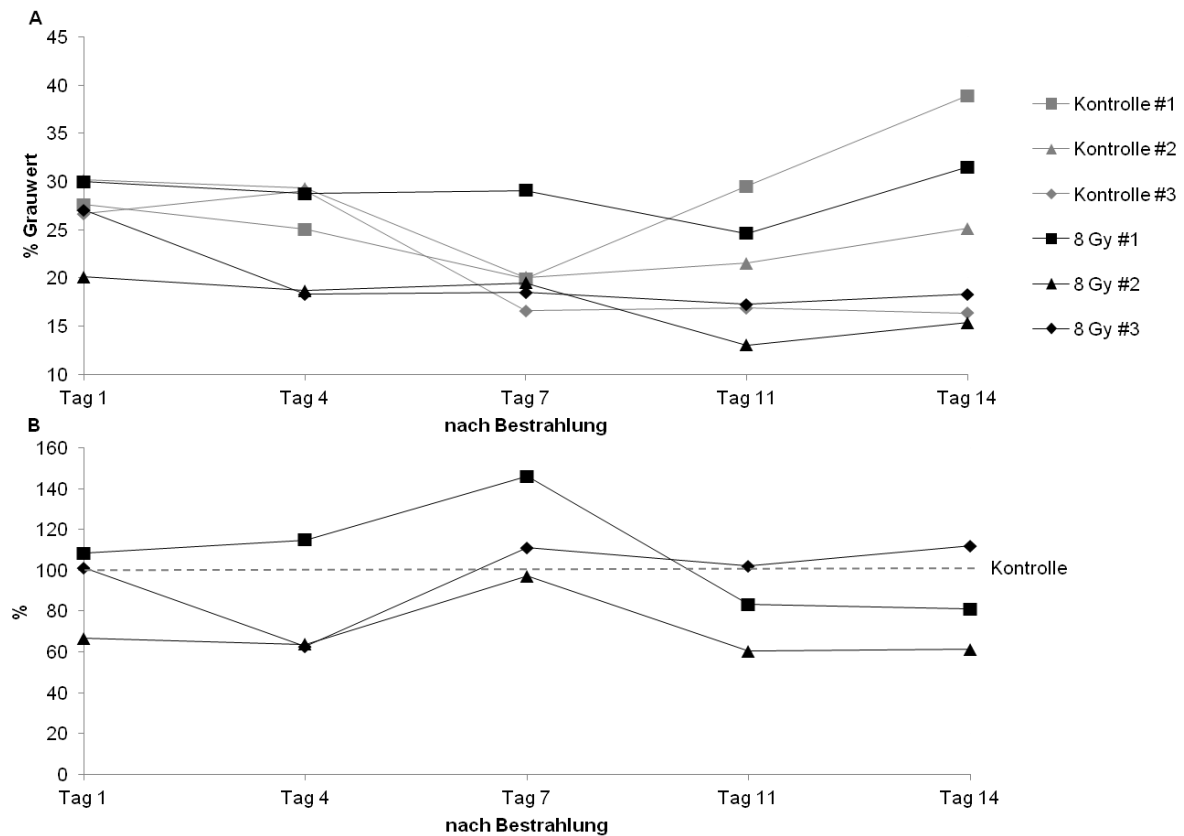


Abbildung 23: Relative Gesamtmenge von Komplex V Monomer in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und mit Röntgenstrahlung bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen. Relative Intensitäten der Grauwerte für die jeweiligen α und β Untereinheiten wurden addiert. Es können keine Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben erkannt werden. Die zeitabhängige Veränderung der Menge vom Komplex V Monomer in den Proben ist ebenfalls nicht erkennbar. Relativer Anteil von Komplex V Monomer in den untersuchten Proben beträgt 13 % bis 39 %. Genauere Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Im Vergleich zu Komplex V Monomer ist die relative Abundanz vom Komplex V Dimer etwas niedriger (siehe Abbildung 24). Die ermittelten Werte liegen hier bei allen Proben zwischen ca. 8 % und 24 % des gesamten Proteins auf dem Gel. An Tag 1 nach der Bestrahlung zeigt sich die relative Menge des Komplexes V Dimer in allen unbestrahlten Proben in etwa gleich bei ca. 21 %. Dagegen liegen die Werte bei zwei von insgesamt drei Replikaten, der bestrahlten Probe an Tag 1 bei ca. 15 %. Würde man das Replikat 3 der bestrahlten Probe an Tag 1 nach der Bestrahlung vernachlässigen, so wäre eine um ca. 25 % bis ca. 32 % starke Abnahme in der Menge vom Komplex V Dimer in bestrahlten Proben, im Vergleich zu unbestrahlten, zu diesem Zeitpunkt erkennbar (siehe Abbildung 24 B). Da lediglich drei Replikate vorhanden sind, müsste, um eindeutige Ergebnisse zu erzielen, das Experiment noch weitere Male wiederholt werden. Dennoch könnte die hier dargestellte Situation am Tag 1 nach der Bestrahlung ein Indiz für eine Abnahme in der Komplex V Dimer Menge nach der Bestrahlung in den OLN-93 Zellen bzw. deren Mitochondrien andeuten. Bei mitochondrialen

Proben, isoliert aus den Zellen zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung, sind Werte für die relative Abundanz von Komplex V Dimer unabhängig von der Behandlung verteilt im Bereich zwischen ca. 8 % und 24 %.

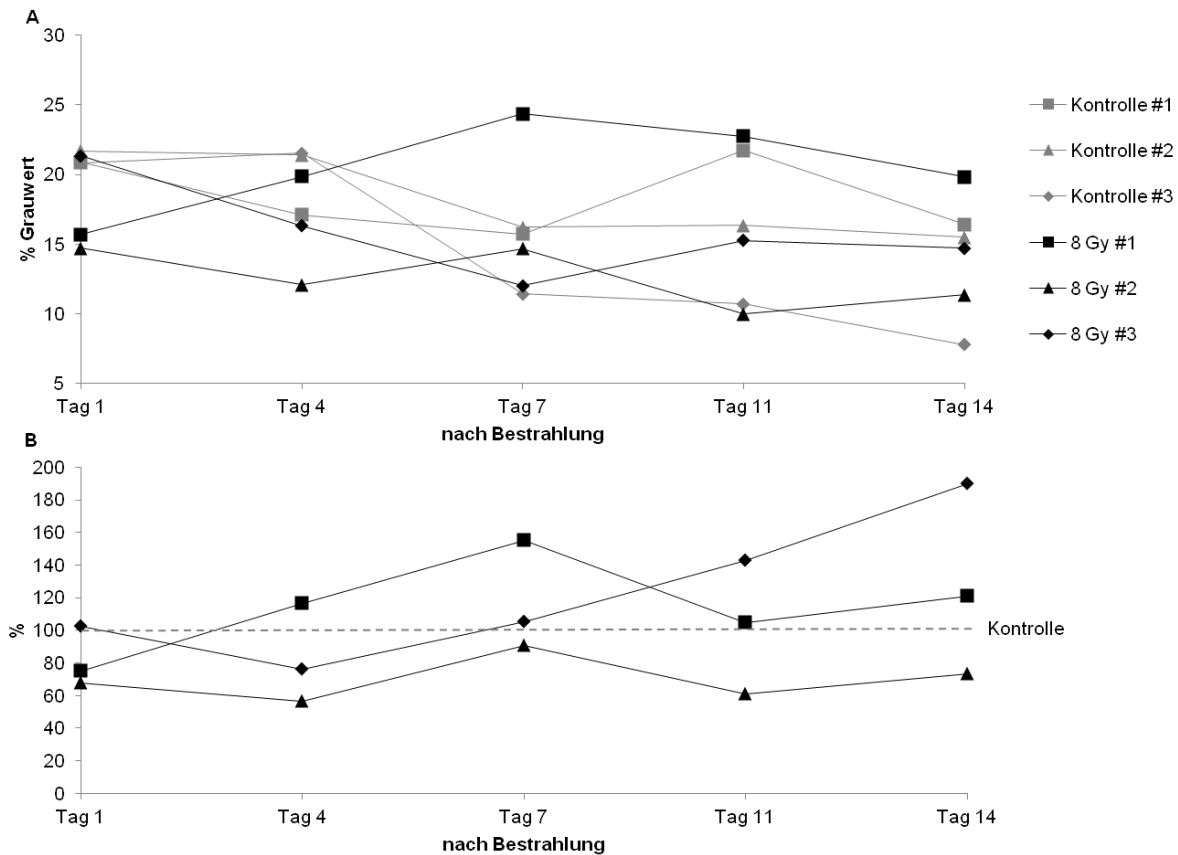


Abbildung 24: Relative Abundanz von Komplex V Dimer in OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (8 Gy) im Vergleich zu unbestrahlten (Kontrolle) OLN-93 Zellen. Relative Abundanz ist errechnet durch das Aufaddieren von prozentualen Anteilen von α und β Untereinheiten der Komplex V Dimer in jeder Probe. Die Werte liegen zwischen ca. 8 % und ca. 24 % vom gesamten Proteingehalt auf einem Gel. An Tag 1 nach der Bestrahlung weisen 2 von insgesamt 3 Replikaten der bestrahlten Proben deutlich niedrigere Abundanz am Komplex V Dimer als unbestrahlte Proben auf. An Tag 7, 11 und 14 variieren die Werte stark. Detaillierte Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass kein eindeutiger Effekt von ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung) mit einer Dosis von 8 Gy auf die Menge vom Komplex V Dimer in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung ersichtlich ist.

Ähnliche Schlüsse wurden auch für Komplex V Monomer, sowie für die einzelnen α und β Untereinheiten gezogen. Da direkt nach der Bestrahlung, vor allem an Tag 1, oft ein Indiz, aber kein eindeutiger Nachweis, für die Änderungen in der Proteinmenge von Komplex V Untereinheiten nach der Bestrahlung beobachtet werden konnten, ist es sinnvoll noch die Gesamtmenge vom Komplex V in den Zellen, bzw. Mitochondrien in Abhängigkeit von der

Bestrahlung darzustellen (siehe Abbildung 25). Hierfür wurden die errechneten Mengen für den monomeren (siehe Abbildung 23) und dimeren Komplex V (siehe Abbildung 24) zusammenaddiert. Es ist an der Stelle erneut wichtig zu betonen, dass der Komplex V nicht nur aus α und β Untereinheiten besteht. Jedoch stellen diese Spots in 2D BN/SDS Gelen die dominantesten Proteinspots dar und ergeben somit einen guten Näherungswert für die relative Mengenberechnung des gesamten Komplexes. Auch hier ist keine Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Menge des Komplexes V zu sehen. Die Werte variieren sehr stark und liegen im Bereich zwischen ca. 24 % und 55 %. Es ist auffällig, dass die Werte von bestrahlten und unbestrahlten Proben an Tag 7, 11 und 14 stärker, als an Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung abweichen. Das starke Abweichen von einzelnen Werten kann darauf deuten, dass die Menge des Proteins stark kulturabhängig ist. Die untersuchten Zellen wurden immer in der gleichen Passage gehalten und unter gleichen Bedingungen kultiviert, dennoch handelt es sich um die Zellen die unabhängig voneinander und zu verschiedenen Zeiten kultiviert worden sind. Bei der bestrahlten Probe könnte dieses auch als ein Effekt der Bestrahlung gewertet werden. Es ist allgemein bekannt, dass die ionisierende Strahlung einen Einfluss auf die Transkription, Translation und proteolytischen Abbau vieler Proteine der Zelle haben kann. Die Schädigungen der Zellen, vor allem auf der DNA Ebene, können in den drei voneinander unabhängigen Experimenten völlig unterschiedlich sein. Dadurch ist es denkbar, dass auch die zellulären Prozesse, wie auch oxidative Phosphorylierung oder Energieverbrauch in den Zellpopulationen unterschiedlich gesteuert werden.

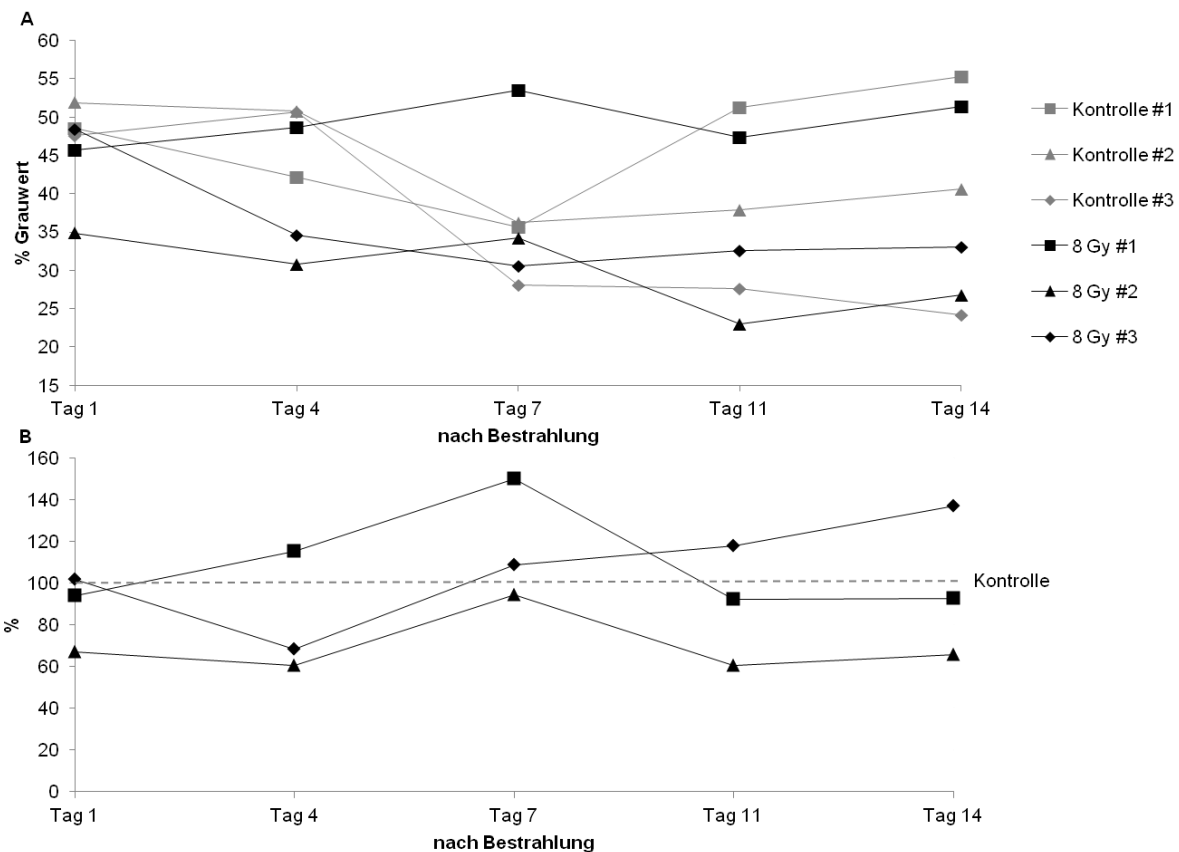


Abbildung 25: Relative Abundanz vom Komplex V in mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen. Die Summe der α und β Untereinheiten vom Komplex V Monomer und Dimer stellt einen guten Näherungswert für die Gesamtmenge vom Komplex V dar. Relative Menge vom Komplex V zeigt keine Unterschiede, abhängig von der Bestrahlung oder dem Zeitpunkt nach der Bestrahlung. Werte liegen breit verteilt im Bereich zwischen 24 % und 55 %. Besonders stark streuen die Werte an Tag 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung. Relative Menge bezieht sich auf die Gesamtmenge aller Proteine eines Gels (A). Außerdem dargestellt sind die Proteinmengen im prozentualen Verhältnis zu entsprechender Kontrolle (B). Genauere Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Ein weiterer Aspekt, der durch die Bestrahlung beeinflusst werden kann, ist die Verteilung der übergeordneten Strukturen untereinander. Das Verhältnis von dimerem und monomerem Komplex V ist in der Abbildung 26 dargestellt.

An Tag 1 nach der Bestrahlung ist erkennbar, dass die Verteilung vom Komplex V Dimer und Monomer bei allen drei Replikaten der unbestrahlten Probe ähnlich aussieht. Das Dimer zu Monomer Verhältnis beträgt hier zwischen 0,7 und 0,8. Dies bedeutet, dass die Menge vom Komplex V Dimer um etwa 1/5 bis 1/3 geringer, als die Menge an Komplex V Monomer ist. Die Werte für das Dimer zu Monomer Verhältnis in bestrahlten Proben ändern sich bei den Replikaten 2 und 3 am Tag 1 nach der Bestrahlung nicht. Allein für das Replikat 1 der bestrahlten Probe ergibt sich ein Wert von ca. 0,5, was bedeutet, dass die Menge vom Komplex V Dimer etwa 1/2 der Menge von Monomer beträgt. Weiter zeigt das Diagramm,

dass sich dieses Verhältnis bei unbestrahlten Proben nach der Bestrahlung bis zum Tag 11 nur geringfügig ändert. An Tag 14 nach der Bestrahlung ergeben sich dagegen für alle 3 Replikate der unbestrahlten Probe deutliche Abnahmen im Dimer zu Monomer Verhältnis. Bei den bestrahlten Proben nimmt die Menge vom Komplex V Dimer im Verhältnis zur Menge vom Monomer zu. Komplex V Dimer ist weiterhin weniger in den Proben vorhanden, liegt dennoch in höherer Menge, als in unbestrahlten Proben, vor.

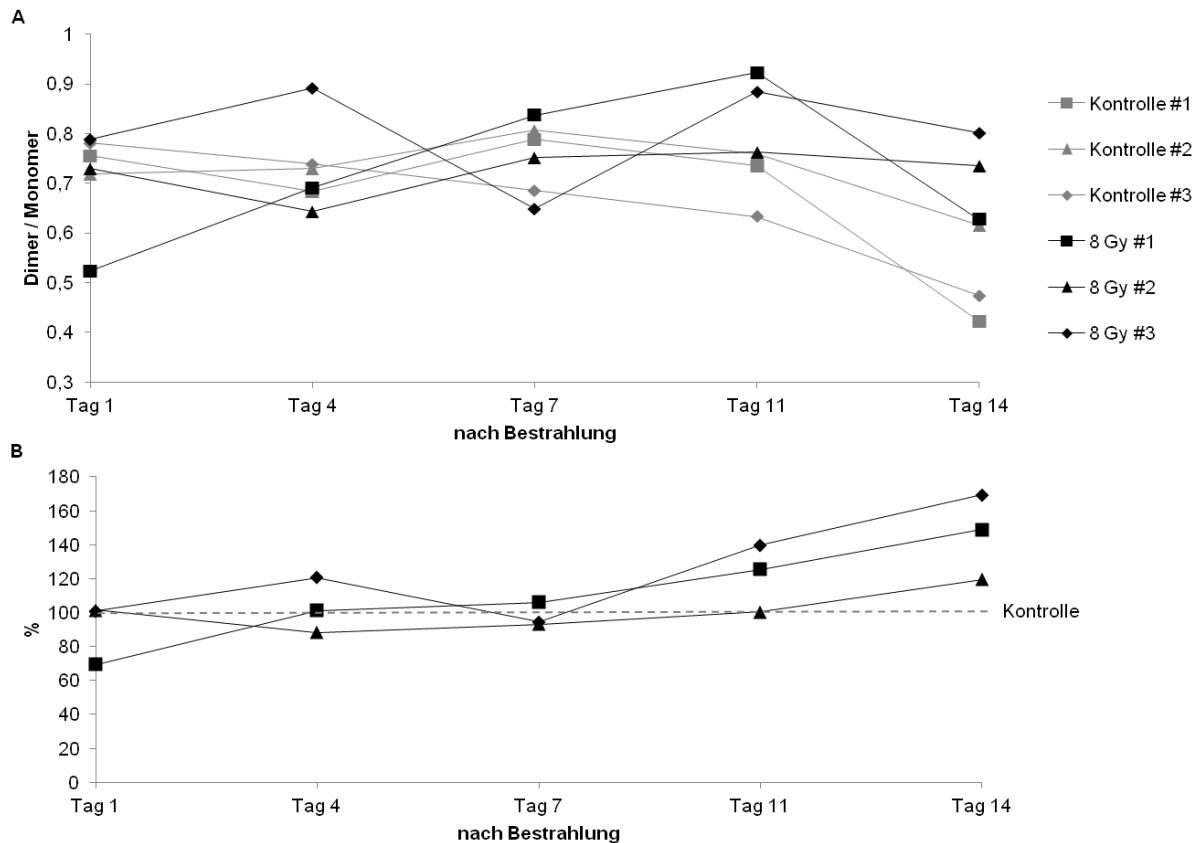


Abbildung 26: Verhältnis vom Komplex V Dimer zu Monomer in unbestrahlten (Kontrolle) und mit Röntgenstrahlung bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung. Bei allen Proben ist dieses Verhältnis kleiner als 1, was bedeutet, dass der Anteil von Komplex V Dimer geringer ist, als vom Monomer (A). Unteres Diagramm (B) zeigt die Verhältnisse von Komplex V Dimer zu Monomer in bestrahlten Proben bezogen auf unbestrahlten Proben. Strahlungsinduzierte Änderungen sind an Tag 11 und 14 erkennbar.

Zusammengefasst kann aus der Abbildung 26 abgelesen werden, dass die Verteilung von monomerem und dimerem Komplex V in den ersten 7 Tagen durch die Bestrahlung unbeeinflusst bleibt. An Tag 11 und 14 tritt eine Zunahme der Menge vom Komplex V Dimer im Verhältnis zu Monomer in bestrahlten, verglichen zu unbestrahlten, Proben auf. Wie in Abbildung 25 verdeutlicht, ist die gesamte Menge von Komplex V an diesen Tagen nicht von der Bestrahlung beeinflusst worden, was bedeutet, dass hier möglicherweise eine Assemblierung von Komplex V Monomeren zu Dimeren stattgefunden hat.

Nach der Fluoreszenzfärbung von 2D BN/SDS Gelen konnten weitere Komplex V Untereinheiten detektiert und analysiert werden (siehe Abbildung 9). Dabei handelt es sich um γ , b und OSCP Untereinheiten des Komplexes V. Die Untereinheiten γ und b konnten nur für das Komplex V Monomer analysiert werden, da für die dimere Formation keine entsprechenden Proteinspots detektierbar sind. Bei den Auswertungen der Menge vom Komplex V Monomer und Dimer ist es wichtig, diese untereinander vergleichen zu können. Aus diesem Grund wurden die Spots für die γ und b Untereinheiten nicht für die Auswertungen der relativen Menge von Monomer oder vom gesamten Komplex V berücksichtigt. Die OSCP Untereinheit könnte sowohl für Komplex V Monomer, als auch für Dimer analysiert werden. Im Vergleich zu der relativen Menge von α und β Untereinheit ist die relative Menge von OSCP Untereinheit gering (zum Teil nur 1,5 %), weshalb diese ebenfalls nicht bei den oben vorgestellten Auswertungen der Mengen vom Monomer, Dimer und gesamten Komplex V einbezogen wurde.

Die γ Untereinheit des Komplexes V besteht aus 272 Aminosäuren (Abrahams et al., 1994) und bildet zusammen mit δ und ϵ Untereinheiten die zentrale drehbare Achse des F_1 -Kopfteils, wodurch der katalytische Teil des Komplexes V mit dem membranintegralen Teil des Rotors verbunden ist (Feniouk and Junge, 2005; Gibbons et al., 2000; Wittig et al., 2007; Wittig and Schagger, 2008).

Die Menge des Komplex V Dimers ist bei allen untersuchten Proben niedriger als die Menge an Monomer (siehe Abbildung 26). Die zu geringe Menge der Untereinheit könnte Grund für die Tatsache sein, dass die γ Untereinheit des Dimers nicht detektiert werden konnte.

Die relative Abundanz der in Komplex V Monomer detektierten γ Untereinheit (siehe Abbildung 9, Spot 95) in mitochondrialen Proben aus den OLN-93 Zellen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (8 Gy) ist in der Abbildung 27 im Vergleich zu unbestrahlten Proben dargestellt. Wie bei der α und β Untereinheit, zeigen sich auch bei der γ Untereinheit keine Unterschiede in der Abundanz abhängig von der Bestrahlung zu allen analysierten Zeitpunkten. Die Werte weichen zum Teil stark voneinander ab, dennoch ist die strahlungsabhängige Tendenz nicht erkennbar. An Tag 4 und 7 nach der Bestrahlung zeigen 2 Replikate sehr starke Abweichungen verglichen zu den übrigen Proben. Die Werte liegen bei allen untersuchten Proben im Bereich zwischen ca. 2 % und ca. 6 %.

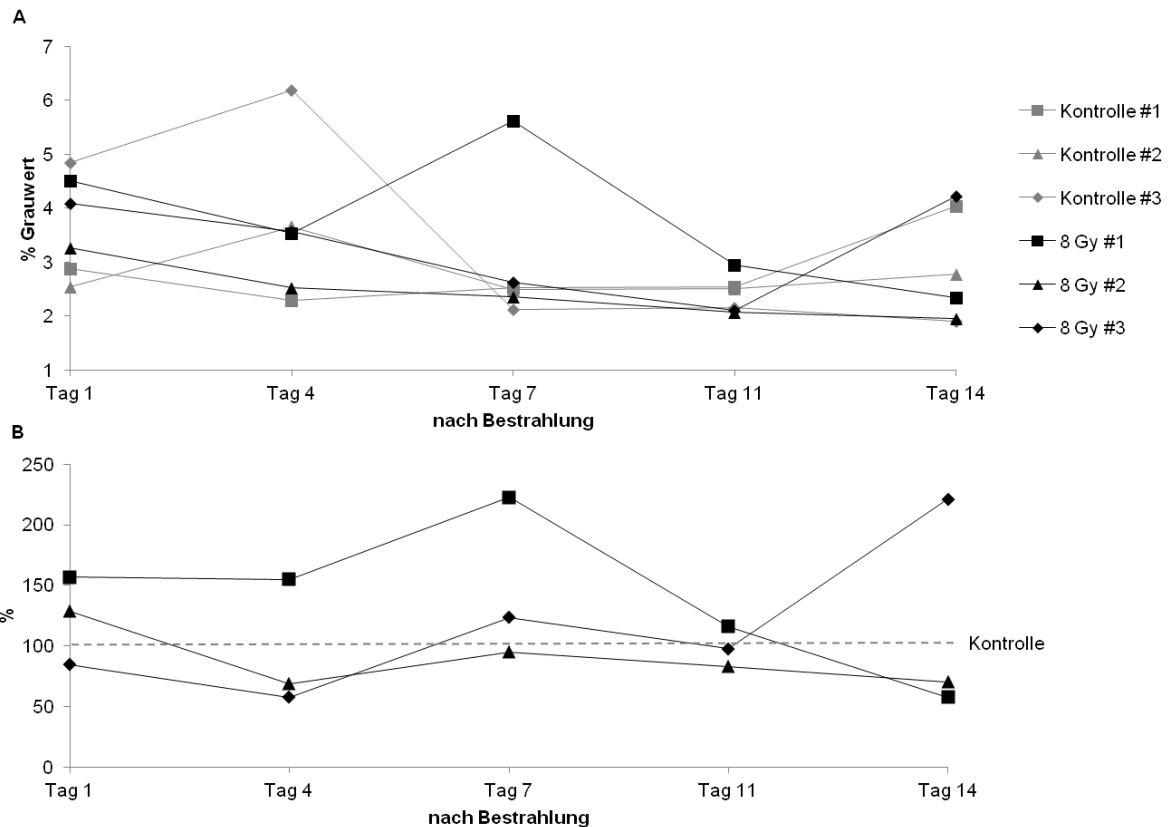


Abbildung 27: Relative Menge der γ Untereinheit von Komplex V Monomer (Spot 95) in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (8 Gy) in mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen (Kontrolle). Strahlungsinduzierte Unterschiede in den relativen Mengen des Proteins sind nicht erkennbar. An Tag 4 und 7 nach der Bestrahlung variieren die Werte stark. Genauere Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Die Abbildung 28 zeigt das zeitliche Verhalten der relativen Menge von der b Untereinheit im Komplex V Monomer (siehe Abbildung 9, Spot 96) nach der Bestrahlung.

Die b Untereinheit bildet den peripheren Stiel des Komplexes V und verbindet somit den 3α 3β -Hexamer mit den restlichen Statorkomponenten im F_0 -Teil (Carbajo et al., 2005; Weber, 2006).

Am Tag 4 nach der Bestrahlung weicht der Wert für das Replikat 3 der unbestrahlten Probe stark von den übrigen fünf ab. Es könnte sich hierbei um einen experimentellen Fehler handeln, weshalb dieser Wert bei weiteren Interpretationen des Diagramms nicht berücksichtigt wird. Die anderen Proben an Tag 4 nach der Bestrahlung und an allen weiteren Untersuchungszeitpunkten zeigen keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Bestrahlung. Die ermittelten Werte für die relative Abundanz der b Untereinheit vom Komplex V liegen bei allen Proben willkürlich verteilt im Bereich zwischen 1,5 % und 4,2 %.

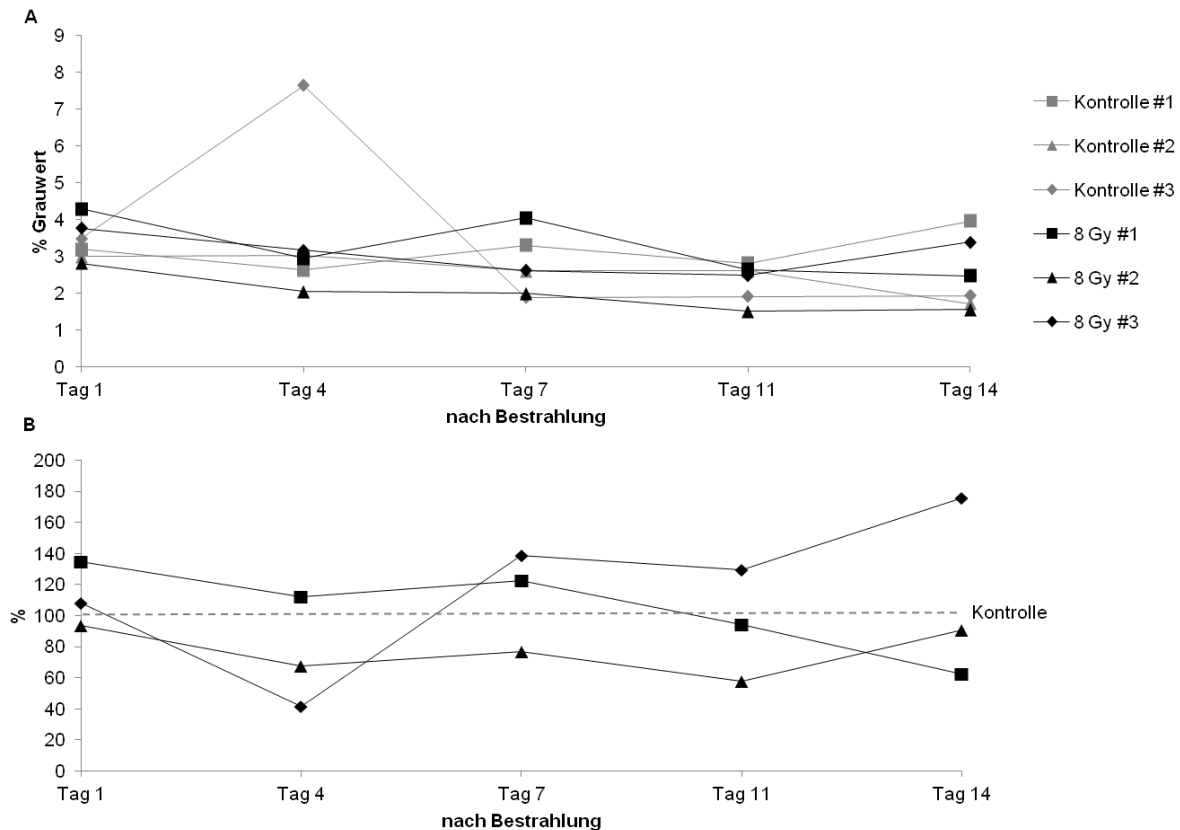


Abbildung 28: Relative Abundanz der b Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spot 96) in mitochondrialen Proben, isoliert aus unbestrahlten (Kontrolle) und mit Röntgenstrahlung bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung. Die densitometrische Auswertung von mit SYPRO Ruby gefärbten Proteinspots zeigt keine Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen. An Tag 4 nach der Bestrahlung weicht der Wert #3 der unbestrahlten Probe stark von den anderen ab (ca. 7,6 %). Abgesehen von #3 unbestrahlter Probe an Tag 4 liegen alle anderen Werte zwischen ca. 1,5 % und 4,2 %. Genauere Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Die letzte Komplex V Untereinheit, die in SYPRO Ruby gefärbten Gelen detektiert und ausgewertet werden konnte, ist die OSCP (*oligomycin sensitivity conferral protein*) Untereinheit. Dabei handelt es sich sowohl um die OSCP Untereinheit aus Komplex V Monomer, als auch aus Komplex V Dimer (siehe Abbildung 9, Spot 97 und 99).

Die Untereinheit OSCP gehört neben den Untereinheiten b, d und F₆ zum peripheren Stiel und sie ist somit auch beteiligt an der Bildung vom Statorsegment des Komplexes V (Carbajo et al., 2005; Weber, 2006).

Die Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen die relativen Mengen dieser Untereinheit im Komplex V Monomer und Dimer. Die densitometrischen Auswertungen von SYPRO Ruby gefärbten 2D BN/SDS Gelen ergeben, dass die relative Abundanz der OSCP Untereinheit vom Komplex V Monomer nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Röntgenstrahlung) unverändert bleibt (siehe Abbildung 29 A). Die OSCP Menge liegt bei ca.

2,2 % bis 6,2 % der Gesamtproteinmenge auf einem Gel (ausgenommen #3, unbestrahlt an Tag 4). Ähnlich wie bei den anderen Untereinheiten vom Komplex V Monomer sind keine zeitabhängigen tendenziellen Veränderungen der relativen Menge in unbestrahlten, wie auch in bestrahlten Proben zu sehen. An Tag 4 weicht das Replikat 3 von der unbestrahlten Probe stark ab, was mit den Analysen der Untereinheiten γ (siehe Abbildung 27) und b (siehe Abbildung 28) übereinstimmt, bei denen selbiges zu beobachten war.

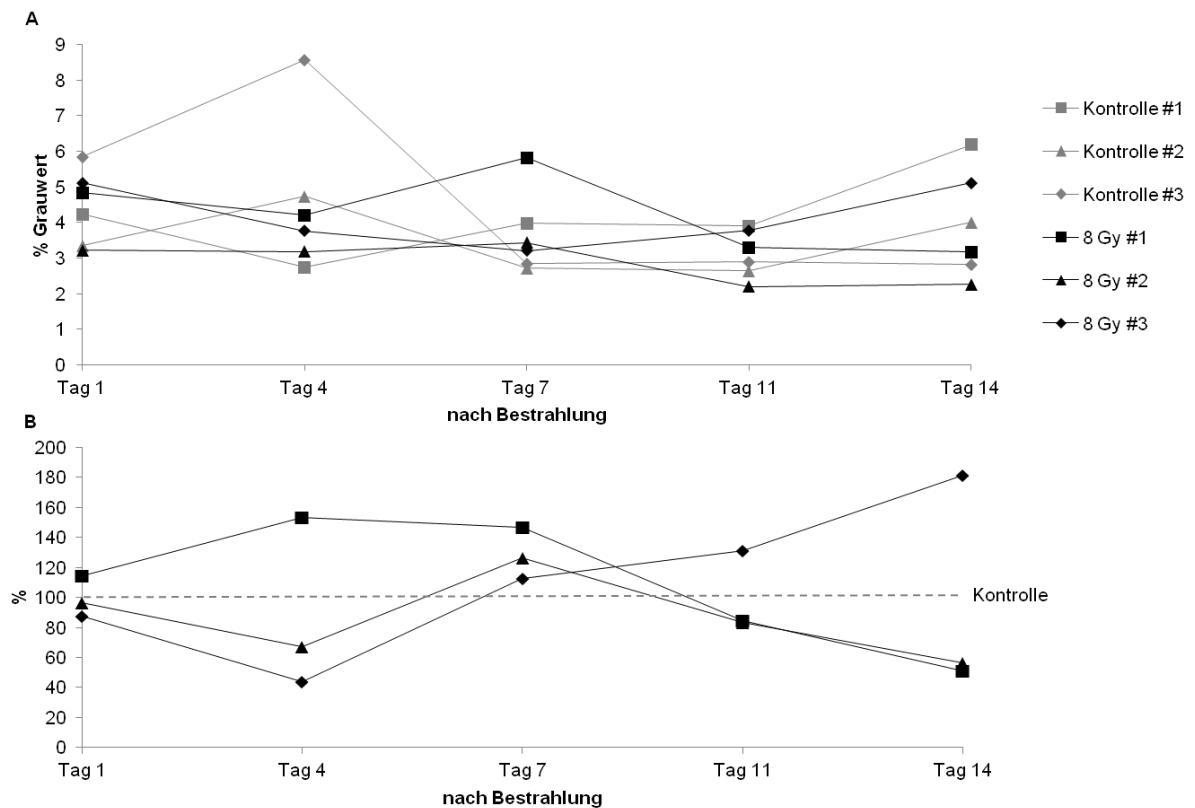


Abbildung 29: Relative Menge der OSCP Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spot 97) in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen. Eine strahlungs-, oder zeitabhängige Veränderung in der Menge der OSCP Untereinheit vom Komplex V Monomer ist nicht erkennbar. Die Werte variieren zwischen ca. 2,2 % und 6,2 %. An Tag 4 nach der Bestrahlung weicht #3 der unbestrahlten Probe sehr stark von den übrigen Proben ab (8,5 %). Strahlungsinduzierte Erhöhung ist unter Berücksichtigung der entsprechenden Kontrollen an Tag 7 nach der Bestrahlung erkennbar (B). Detaillierte Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Im Bezug auf die Zugehörigkeit der Proben zu einer Experimentdurchführung (siehe Abbildung 29 B) zeigt sich an Tag 7 eine strahlungsinduzierte 12 % bis 47 %-iger Zunahme an der Menge der OSCP Untereinheit, im Vergleich zu unbestrahlter Probe.

Die Ergebnisse zur relativen Abundanz von der OSCP Untereinheit aus Komplex V Dimer können ähnlich interpretiert werden (siehe Abbildung 30). Die Strahlungsabhängige Zunahme an der relative Menge von OSCP Untereinheit aus dem Dimer von ca. 5 % bis ca.

58 % ist nur in der Relation zu den zugehörigen Kontrollen an Tag 7 erkennbar. Analog zu anderen vorgestellten Untereinheiten vom Komplex V Dimer, fallen die relativen Mengen der OSCP Untereinheit im Dimer etwas geringer als im Monomer aus und betragen zwischen ca. 1,5 % bis ca. 4,1 % (ausgenommen #3 unbestrahlter Probe an Tag 1) bezogen auf die gesamte Proteinfärbung in einem Gel. Somit beläuft sich die Menge vom Dimer in allen Proben im Durchschnitt auf etwa 1/2 bis 1/5 der Menge vom Monomer.

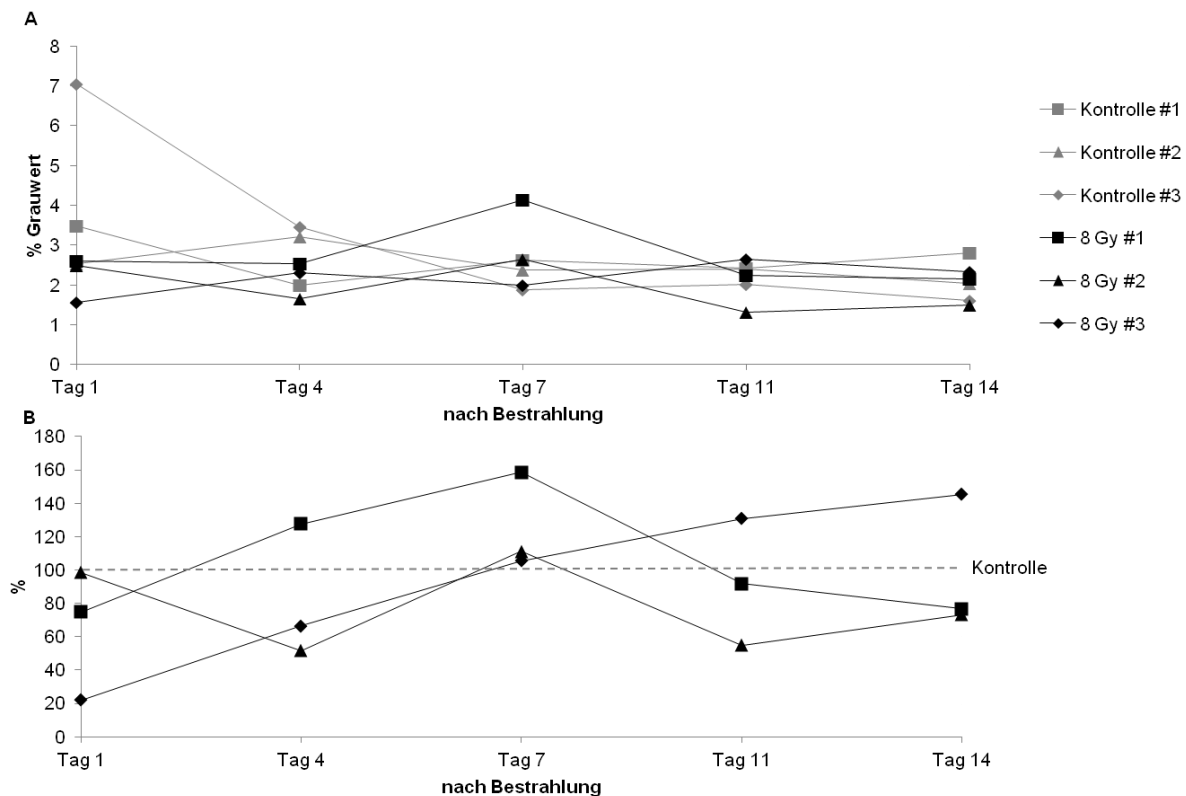


Abbildung 30: Relative Abundanz der OSCP Untereinheit vom Komplex V Dimer in eine Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung in mitochondrialen Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen. Eine Abhängigkeit von Bestrahlung oder von Zeit ist nicht erkennbar. Die ermittelten Werte liegen im Bereich zwischen ca. 1,5 % und 4,1 %. An Tag 1 weicht #3 der unbestrahlten Probe stark ab. Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Die relativen Mengen der OSCP Untereinheit in dimerem Komplex V stehen in etwa im gleichen Verhältnis zu den Mengen im Monomer, wie auch die oben dargestellten Dimer und Monomer Mengen (siehe Abbildung 26). So zeigt sich auch hier an Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung eine Erhöhung von OSCP Dimer zu OSCP Monomer Verhältnisses (Daten werden nicht dargestellt; Ersichtlich beim Vergleich der Abbildung 29 A und Abbildung 30 A). Diese Beobachtung unterstützt die Aussagekraft der angewandten Methode.

Anders als bei den Untereinheiten der Komplexe I (siehe Abbildung 10) und III₂ (siehe Abbildung 12) können für Komplex V Untereinheiten zusammengefasst keine eindeutigen Effekte der ionisierenden Bestrahlung beobachtet werden. Die tendenziellen Veränderungen, wie Abnahme vom Dimer an Tag 1 nach der Bestrahlung, konnten nur unter Berücksichtigung von einzelnen Experimenten und zum Teil durch Ausschließung von einzelnen Werten aus Interpretation erkannt werden (siehe Abbildung 24). Verglichen zur Kontrolle, zeigen die Analysen der Anteile von dimerem und monomerem Komplex V in den Proben eindeutig eine Verschiebung von diesem Verhältnis zu Gunsten vom Komplex V Dimer an Tag 11 und 14 nach Bestrahlung. Dieses ist sowohl bei den Analysen der OSCP Untereinheit im Monomer und Dimer (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30), als auch bei der Analyse vom Verhältnis Dimer zu Monomer (siehe Abbildung 26) erkennbar. Die Zunahme vom Komplex V Dimer im Verhältnis zu dem Monomer an Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung deuten auf die erhöhte Assemblierungsrate in bestrahlten Proben, da die Gesamtmenge von Komplex V zu diesen Zeitpunkten in unbestrahlten und bestrahlten Proben ähnlich ist. Es ist außerdem zu bemerken, dass die ermittelten relativen Mengen für die α und β Untereinheiten deutlich stärker voneinander abweichen, als für die Untereinheiten von Komplexen I und III₂, obwohl bei dem Komplex V keine Abhängigkeit von Bestrahlung oder Zeit erkennbar ist. Da es sich bei den Untereinheiten α und β vom Komplex V um die dominantesten Spots auf den Gelen handelt, waren diese Schwankungen nicht zu erwarten, weil hier die Spotdefinierung genauer erfolgen kann. Erstaunlicherweise weichen die ermittelten Werte für Spots mit kleineren Intensitäten weniger stark ab, als die Werte für diese dominantesten Spots. Bei den kleineren Untereinheiten, γ , b und OSCP, weichen die einzelnen Replikatwerte deutlich weniger voneinander ab. Dafür gibt es einzelne Werte, die sich um ein Mehrfaches von allen anderen unterscheiden und bei der Interpretation der Daten deshalb nicht berücksichtigt werden konnten. Weiterhin muss erneut darauf hingewiesen werden, dass die geringe Anzahl der Replikate keine statistischen Aussagen erlaubt und in der Zukunft weitere Durchläufe im Rahmen der Weiterführung des Projekts durchgeführt werden müssten. Außerdem ist die Anzahl der Proteinspots, die dem Komplex V Monomer und Dimer bzw. Atmungskettekomplexen zugeordnet werden konnten, zu gering. Deshalb sollte man weiter an der Optimierung der Methode für die Proben aus Zellkultur arbeiten.

4.1.2.2 Hitzeschockproteine

Eine andere Proteinklasse, die mittels dieser Methode gut untersucht werden konnte, stellen die Hitzeschockproteine (HSPs) dar. Für diese Proteine, die bei Stresssituationen in der

Steuerung der physiologischen Prozesse involviert sind (Arya et al., 2007; De Maio, 1999), waren die Änderungen der Proteinmenge nach der Bestrahlung zu erwarten. Unter zellulärem Stress schützen die HSPs Proteine vor Denaturierung oder leiten den proteolytischen Abbau beschädigter Proteine ein. Bei normalen physiologischen Bedingungen fundieren die meisten HSPs als Chaperone und sind an der korrekten Faltung vieler Polypeptidketten oder an der Refaltung fehlerhaft gefalteter Proteine, sowie an der Translokation von Proteinen in verschiedene Zellkompartimente beteiligt (Arya et al., 2007; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Die vielfältigen Funktionalitäten von HSPs sind vor allem den Fähigkeiten von HSPs zur Interaktion mit sehr vielen zellulären Proteinen zu zuschreiben (Csermely, 2004). Weitere wichtige Funktionen von HSPs ergeben sich durch deren Eingriffe in Apoptosewege (Csermely, 2004; Gabai et al., 2005; Pandey et al., 2000; Wu et al., 2014). Weiterhin sind bei einigen Krankheiten die Überexpressionen von HSPs oft im Zusammenhang mit einem schlechten Krankheitsverlauf beschrieben. Insbesondere sind tumorfördernde Wirkungen durch Begünstigung von der Angiogenese und der Therapieresistenz durch antiapoptotische Schutzwirkung bekannt (Wu et al., 2014).

Die Abbildung 31 zeigt ein SYPRO Ruby gefärbtes Gel, mit farblich markierten und nummerierten Spots, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden konnten. Neben den Proteinspots der Atmungskette (rot, grün und blau) sind mit orangener Farbe diejenigen Spots, die zur Proteinfamilie der HSPs zugeordnet werden konnten, gekennzeichnet. Dabei handelt es sich um die Spots der Proteine: HSP60 (Nr. 48), HSP90 β (Nr. 22), und *Hypoxia up-regulated protein 1* (Nr. 10). Diese Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe MALDI-TOF PMF Methode identifiziert werden (siehe 4.1.1). Die Nomenklatur der Spots findet sich in der Tabelle 1. Bei dem HSP60 handelt es sich um das mitochondriale Chaperon, während HSP90 β aus dem Zytoplasma und *Hypoxia up-regulated protein 1* aus dem endoplasmatischen Retikulum stammen. Bei der hier angewandten Aufreinigungsmethode handelt es sich um eine schnelle und sanfte Methode, bei der die Aktivität und Integrität von Mitochondrien im Mittelpunkt steht. Aus diesem Grund sind auch Proteine aus dem Zytoplasma und anderen Zellkompartimenten in den Proben zum Teil vorhanden. Außerdem könnten die bislang ausschließlich in einem Zellkompartiment nachgewiesene Proteine durchaus in mehreren Kompartimenten vorhanden sein.

Anhand der Lage von einzelnen Spots im Gel in Bezug auf die Positionen zueinander, sowie zu der oben abgebildeten BN-Spur kann gesehen werden, ob die einzelnen Proteine aus einer assemblierten Proteinorganisation stammen. Von links nach rechts im Gel sind Proteine bzw. Proteinuntereinheiten vorzufinden, welche aus Proteinorganisationen mit steigender Molekularmasse stammen. Abhängig von der Größe wandern diese Proteine,

bzw. Untereinheiten im SDS Gel (2. Dimension) unterschiedlich weit von oben nach unten. So z.B. ist das HSP60 Protein mit Molekularmasse von ca. 60 kDa wie in der Abbildung 31 zu sehen, im Vergleich zu den Spots der Proteine HSP90 β und *Hypoxia up-regulated protein 1*, rechts positioniert. Das heißt, dass das HSP60 Protein aus einer komplexeren Proteinorganisation stammt. Im Jahr 2006 wurde bereits von Reifschneider et al. publiziert, dass es sich hierbei um das Homoheptamer (ca. 420 kDa) handelt (Reifschneider et al., 2006).

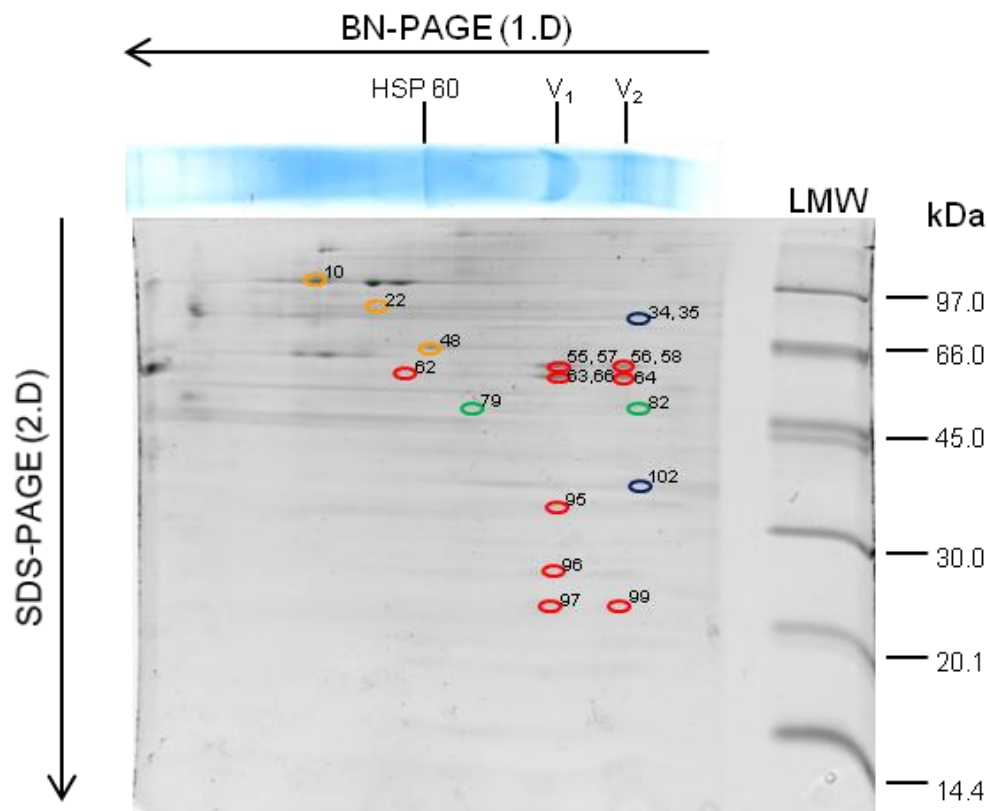


Abbildung 31: SYPRO Ruby gefärbtes 2D BN/SDS Gel. Markiert sind Proteinspots der Atmungskette (siehe Abbildung 9; rot grün, blau) und in orange die Proteinspots der HSPs. Die gekennzeichneten Spots wurden mithilfe Delta2D Software densitometrisch analysiert und die relativen Proteinmengen ermittelt. Die Spots sind nummeriert wie im Abschnitt 4.1.1. Über dem Gel ist die BN-Spur, mit beschrifteten Banden für HSP 60, V₁ (Komplex V Monomer) und V₂ (Komplex V Dimer) montiert. Mit Pfeilen ist die jeweilige Auftrennungsrichtung bei der 1. und 2. Dimension gezeigt. Am Rande vom jedem Gel wurde in eine Gel-Tasche 1,5 μ L von Proteinmassenstandard (LMW [kDa]) aufgetragen. HSPs Spotszuordnung: 10-*Hypoxia up-regulated protein 1* (gehört zu HSP70 Proteinen), 22-HSP90 β , 48-HSP60.

Neben seiner Funktion als Chaperon spielt das HSP60 Protein sowohl in proapoptotischen, als auch antiapoptotischen Signalwegen eine Rolle. Dabei wird die antiapoptotische Wirkung meistens, aber nicht ausschließlich dem zytosolischen HSP60 zugeschrieben, während das mitochondriale HSP60 die Maturation von Procaspase-3 fördert und somit proapoptotisch wirkt (Arya et al., 2007). Im Zusammenhang mit proapoptotischer Wirkung von HSP60 zeigt

eine Studie über das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, dass die Patienten mit erhöhter HSP60 Expression bessere Genesungschancen haben (Faried et al., 2004). Antiapoptotische Wirkung von mitochondrialem HSP60 ist beispielsweise in einer *in vitro* Studie beschrieben. Dabei wird postuliert, dass das HSP60 durch die Aufrechterhaltung von mitochondrialer oxidativen Phosphorylierung einer Schutzfunktion gegenüber, durch intrazelluläres β -Amyloid induzierte, neuronale Dysfunktion und Zelltod aufweist (Veereshwarayya et al., 2006).

Die relative Abundanz von mitochondrialen HSP60 (siehe Abbildung 31, Spot 48) in den Proben, aus mit Röntgenstrahlung (8 Gy) behandelten OLN-93 Zellen im Vergleich zur Proben aus unbehandelten Zellen, ist in Abbildung 32 zu sehen. Wie auch bei den Analysen von Proteinen der Atmungskette, sind auch hier die möglichen Effekte der Bestrahlung in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung untersucht worden.

Eine Zunahme in der HSP60 Menge in bestrahlten Proben im Vergleich zu unbestrahlten Proben ist eindeutig an den Tagen 1 und 4 nach der Bestrahlung erkennbar. Die Werte der unbestrahlten Proben liegen an Tag 1 bei ca. 6 % bis 8,5 %, während bei bestrahlten Proben die Werte zwischen 10,4 % und 11,4 % ermittelt wurden. An Tag 4 nach der Bestrahlung befinden sich bei unbestrahlten Proben die Werte im Bereich zwischen 8 % und 10 %, während der Wert der bestrahlten Proben zwischen 10,7 % und 11,4 % liegt. So ist an Tag 1 nach der Bestrahlung im Durchschnitt ein ca. 50 %-iger und an Tag 4 ein ca. 30 %-iger strahlungsabhängiger Anstieg zu verzeichnen. Zu den späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung sind keine eindeutigen Effekte zu sehen. Zwar zeigen sich unter Betrachtung von bestrahlten Proben im direktem Vergleich zu entsprechenden Kontrollen bei jeweils zwei der insgesamt drei Replikate auch an Tag 7 und 11 nach der Bestrahlung die Erhöhungen der HSP60 Menge (siehe Abbildung 32 B), da aber die ermittelten Werte an diesen Tagen stark variieren (siehe Abbildung 32 A), können diese Unterschiede nicht als strahlungsbedingt angesehen werden. An Tag 14 nach der Bestrahlung sind relative Mengen von HSP60 in unbestrahlten und bestrahlten Proben gleich. Weiterhin zeigt sich, dass die relative HSP60 Menge in unbestrahlten Proben über die Zeit etwas stärker, als in den bestrahlten Proben variiert (siehe Abbildung 32 A). Parallel zeigt sich im selben Zeitraum in bestrahlten Proben beinahe die unveränderte relative Menge von HSP60.

Die Langzeitstudie (Tag 14 bis 240 nach der Bestrahlung) über die Wirkung der Röntgenstrahlung (8 Gy) auf die HSP60 Abundanz in humanen Fibroblasten, in der Arbeitsgruppe um Prof. Dencher, zeigte eine Zunahme in der HSP60 Abundanz, erst ab Tag 21 nach der Bestrahlung, welcher sich bis zum Tag 240 nach der Bestrahlung nicht änderte. An Tag 14 nach der Bestrahlung erwies sich die HSP60 Abundanz in bestrahlten Proben um

den Faktor 1,2 niedriger als in unbestrahlten Proben (Frenzel, 2011). Im Vergleich dazu, zeigt die in Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kurzzeitstudie, dass die relative HSP60 Abundanz in Proben aus bestrahlten OLN-93 Zellen direkt nach der Bestrahlung (Tag 1 und 4), verglichen zu unbestrahlten Proben, anstieg. In den Studien an humanen Fibroblasten von Frenzel wurde neben HSP60-Heptamer ein weiteres, etwas kleineres Oligomer gefunden (Frenzel, 2011). Bei den hier analysierten Proben aus je $1,5 \times 10^6$ OLN-93 Zellen pro Gel, kann nach der SYPRO Ruby Färbung (siehe Abbildung 31) nur das HSP60-Heptamer detektiert werden. Bei der Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF MS PMF konnte nach der Silberfärbung (siehe Abbildung 8, Spot 41) noch HSP60 Monomer detektiert werden. Dieser Spot konnte, vermutlich aufgrund geringerer Menge der analysierten Proben, bei der quantitativen Proteinmenge Analyse nicht eindeutig zugeordnet werden.

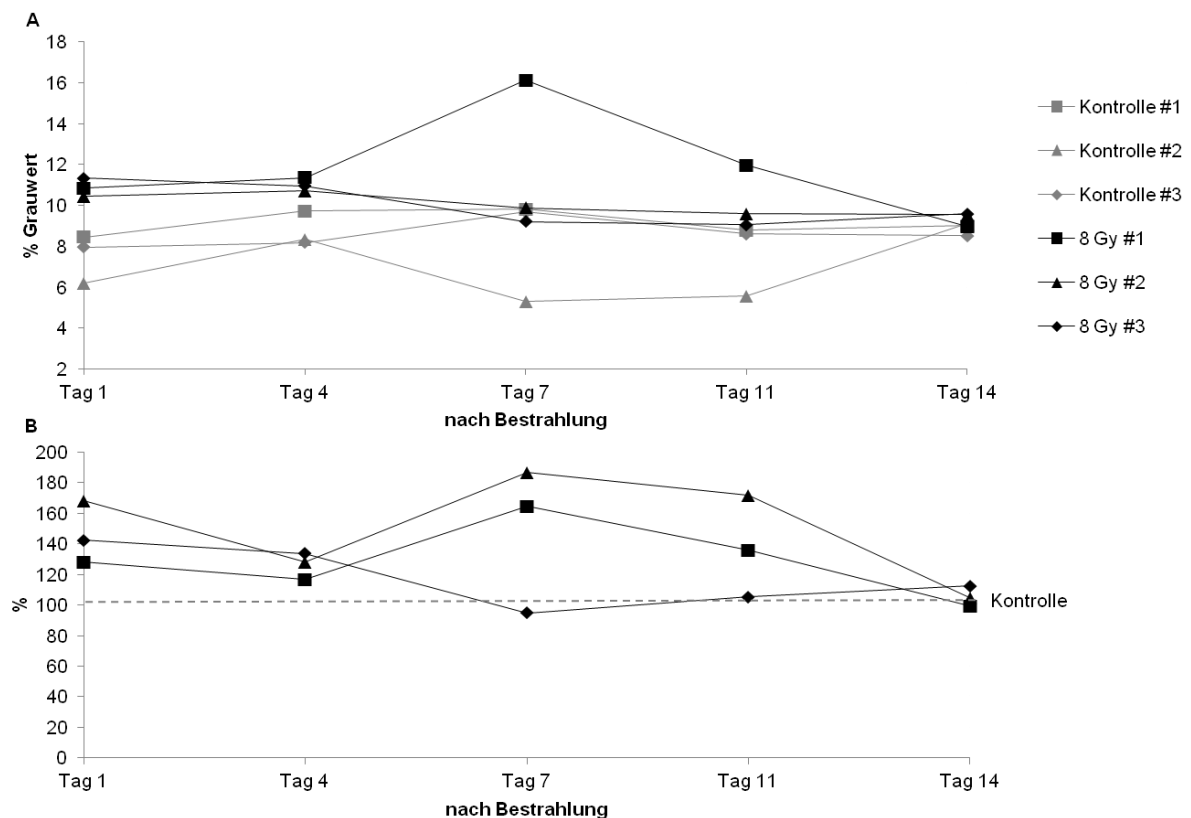


Abbildung 32: Relative Menge von mitochondrialen HSP60 (siehe Abbildung 31, Spot 48) in den Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (Röntgenstrahlung, 8 Gy) OLN-93 Zellen an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung. Die Werte der Replikate stimmen überein (zum Teil liegen die Werte übereinander), ausgenommen an Tag 7 und 11. Eindeutige Unterschiede in den relativen Mengen von HSP60 sind an Tag 1 und 4 zu sehen. An Tag 7, 11 und 14 sind keine eindeutigen Unterschiede in der HSP60 Abundanz erkennbar. Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Bei der HSP90 β handelt es sich, neben HSP90 α , um eine der beiden bekannten Isoformen des HSP90 Proteins im Zytoplasma von Säugerzellen (Nemoto and Sato, 1998). Mit 1 % bis 2 % des Gesamtproteins einer Zelle ist das HSP90 Protein, sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen, eins der meist exprimierten Proteine und liegt als Monomer oder Homodimer vor (Nemoto and Sato, 1998; Ou et al., 2014). Eine wichtige Rolle scheint HSP90 bei den pathogenen Veränderungen in malignen Krebserkrankungen (Tumorstadium, Angiogenese und Metastasenbildung), sowie bei der Alzheimer Demenz zu spielen (Luo et al., 2008; Ou et al., 2014). Weiterhin wirkt HSP90 der Strahlentherapie durch die antiapoptotische Eingriffe in die Signalwege entgegen (Wu et al., 2014). In Säugerzellen findet die Expression von 84 kDa schweren HSP90 β kontinuierlich und vom Hitzestress unabhängig statt, während HSP90 α Expression durch die Hitze induziert wird (Ou et al., 2014).

Die relative Menge von HSP90 β ist in der Abbildung 33 dargestellt. Die Werte streuen hier deutlich stärker (siehe Abbildung 33 A), als bei der Bestimmung von relativen Mengen für das mitochondriale HSP60 (siehe Abbildung 32 A). Da es sich hierbei um ein zytosolisches Protein handelt, könnten diese Unterschiede durch die Aufreinigungsschritte hervorgerufen werden. Immerhin handelt es sich hierbei um die Analysen an mitochondrialen Proben und zytosolische oder anderweitige Proteine stellen eine Kontamination der Probe dar. Dennoch kann man die relativen Mengen untereinander gut vergleichen, da die Aufreinigungsprotokolle strikt gleich gehalten wurden. Vor allem die Werte, die zu ein und dem gleichem Experimentdurchlauf gehören, sind direkt vergleichbar, weil hier die gleichzeitige Probeaufarbeitung stattgefunden hat.

Eine Zunahme in der relativen Abundanz von HSP90 β zwischen Proben aus unbehandelten und aus Röntgenstrahlung-ausgesetzten Zellen ist am Tag 1 nach der Bestrahlung zu sehen. Die Werte für unbehandelte Replikate liegen im Bereich zwischen 4 % und 6,5 %, während für die bestrahlten Replikate diese bei 8 % bis 10 % sind. Somit ergibt sich an Tag 1 nach der Bestrahlung im Durchschnitt eine Mengenzunahme des HSP90 β Proteins um Faktor 1,5. An Tag 4 und 7 nach der Bestrahlung sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen beiden Probengruppen erkennbar. Jedoch unter Betrachtung von bestrahlten Proben im direkten Verhältnis zur dazugehörigen unbestrahlten Probe (gleiche Experiment), ist auch an Tag 4 eine geringe Zunahme in der Proteinabundanz nach der Bestrahlung ersichtlich (siehe Abbildung 33 B). Dagegen zeigt sich an Tag 7 nach der Bestrahlung in bestrahlten Proben eine leichte Reduzierung der HSP90 β Menge im Vergleich zu unbestrahlten Proben. Auch an Tag 11 können bei zwei der drei Replikate deutliche Zunahmen gesehen werden. Da aber zu diesem Zeitpunkt die Werte stark variieren, können diese Unterschiede nicht als

strahlungsbedingt erklärt werden. Tag 14 der Analyse liefert keine Unterschiede in der Abundanz vom HSP90 β .

Deutliche Zunahme in der relativen Abundanz von HSP90 β direkt nach der Bestrahlung (Tag 1) kann eindeutig als strahlungsabhängiger Effekt definiert werden. Somit scheint röntgenstrahlungsinduzierter Stress, anders als Hitzestress (Ou et al., 2014), einen induzierbaren Effekt auf die Expression von HSP90 β zu haben.

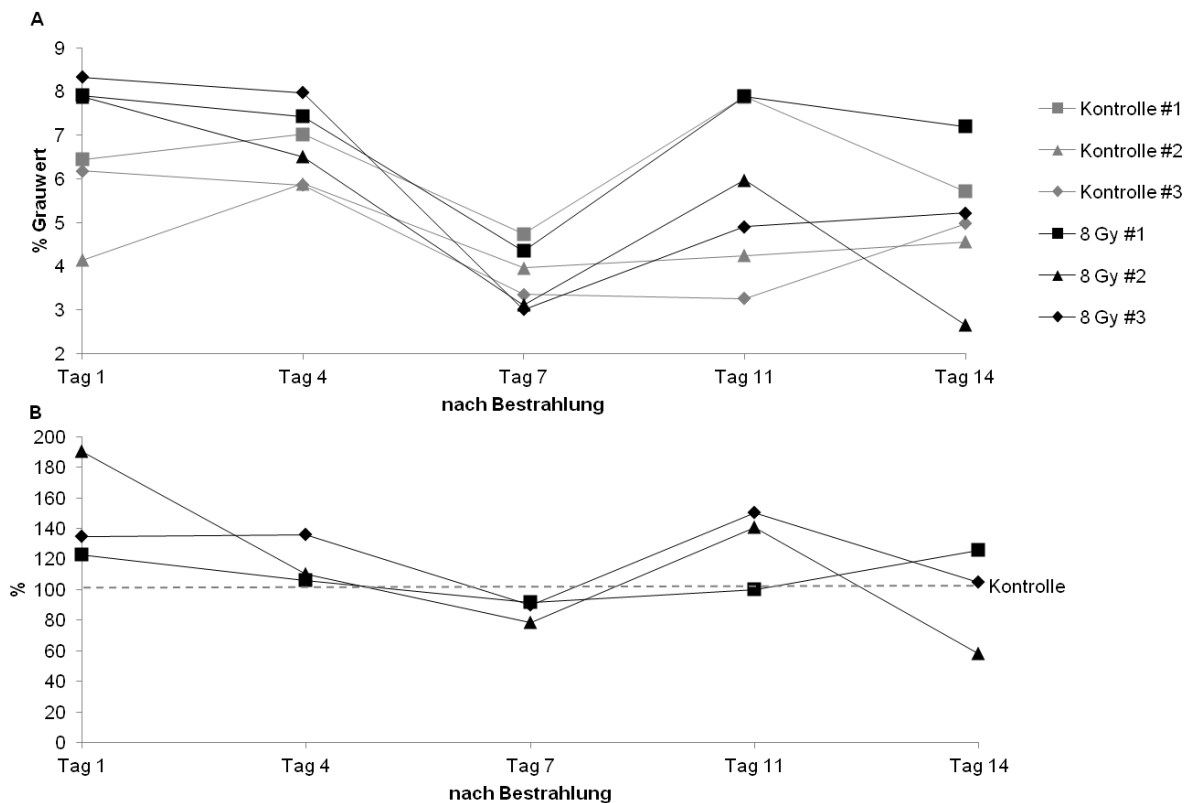


Abbildung 33: Relative Abundanz von HSP90 β Protein in Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung. An Tag 1 nach der Bestrahlung ist eine deutliche Zunahme in der relativen HSP90 β Menge erkennbar. Unter Berücksichtigung der Zugehörigkeit der Proben zu einem Experimentdurchlauf sind auch an Tag 4 eine Zunahme sowie eine leichte Abnahme an Tag 7 nach der Bestrahlung zu sehen (B). Für spätere Zeitpunkte nach der Bestrahlung sind keine Unterschiede zwischen beiden analysierten Gruppen ersichtlich. Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Dafür, dass es sich hierbei um ein nicht mitochondriales Protein handelt, sind die ermittelten relativen Mengen zum Teil unerwartet hoch (über 8 %). Dieses kann dadurch erklärt werden, dass es sich hierbei um eines der am stärksten exprimierten Proteine der Zelle handelt (Nemoto and Sato, 1998). Außerdem ist das Protein mit der Molekularmasse von 84 kDa eines der größten hier analysierten Proteine, wodurch auch eine stärkere Färbeintensität angenommen werden kann, da der SYPRO Ruby Farbstoff sich an das Peptidrückgrat und an basische Aminosäuren anlagert. Weiterhin kann, trotz der beschriebenen zytosolischen

Lokation von HSP90 β (Nemoto and Sato, 1998), die Möglichkeit des Befindens von dem Protein auch in Mitochondrien nicht ausgeschlossen werden.

Das 111 kDa schwere *Hypoxia up-regulated protein 1* (Hyou1) wird auch als *oxygen-regulated protein 150* (ORP150), *glucose-regulated protein* (GRP170) oder auch CBP-140 bezeichnet. Es gehört zur HSP70 Proteinfamilie und ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Das Protein scheint bei vielen Prozessen eine wichtige Rolle zu spielen, wie z. B.: Sekretion von Insulin, Apoptose und Wundheilung. Wegen seiner anti-apoptotischen Wirkungsweise sind bereits auch Hypothesen gestellt worden, dass das Protein Hyou1 nicht nur im endoplasmatischen Retikulum, sondern auch in Mitochondrien lokalisiert ist (Arrington and Schnellmann, 2008).

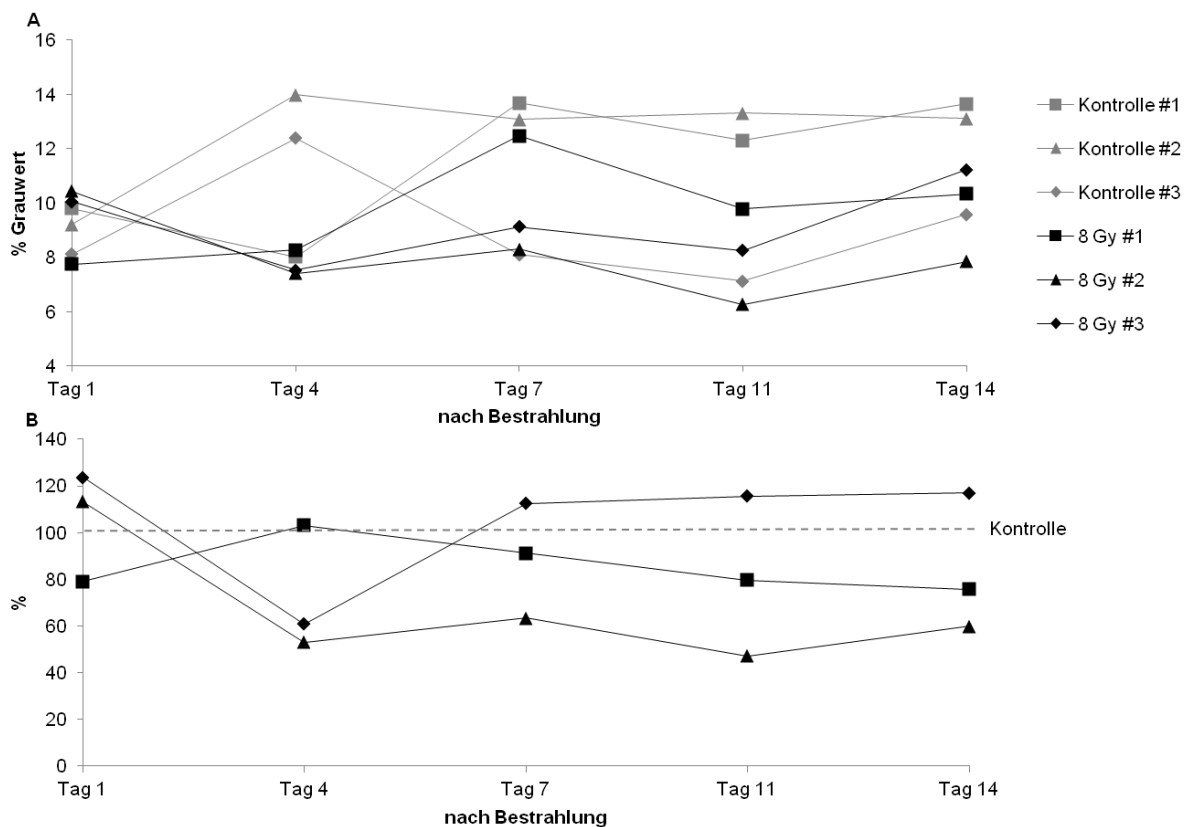


Abbildung 34: Relative Abundanz von *hypoxia up-regulated protein1* (Hyou1) in Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) und mit Röntgenstrahlen bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung. Zwischen beiden Probengruppen sind keine eindeutigen Unterschiede erkennbar. Die Werte streuen unabhängig von der Behandlung oder Zeit im Bereich zwischen ca. 6 % und 14 %. Genauere Diagrammbeschriftung ist der Legende zu Abbildung 10 zu entnehmen.

Die quantitative Analyse der relativen Mengen von Hyou1 in den Proben aus unbehandelten und mit Röntgenstrahlung behandelten OLN-93 Zellen verdeutlicht die Abbildung 34. Auch hier soll angemerkt werden, dass die relative Menge des Proteins hoch ist. Eine mögliche

Erklärung ist der bereits oben beschriebene Zusammenhang zwischen Größe des Proteins und Färbeintensität. Indessen unterstützt diese Beobachtung möglicherweise die von Arrington et al. erstellte Hypothese, dass sich das Hyou1 Protein sowohl in dem endoplasmatischen Retikulum, als auch in Mitochondrien befinden kann (Arrington and Schnellmann, 2008). Denn die relativen Mengen von einem ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum befindlichen Protein von bis zu 14 % in mitochondrialen Proben, sind trotz zu erwartenden Kontaminationen bemerkenswert hoch. Die Werte für die beiden Probengruppen weisen sehr starke Unterschiede zwischen den Replikaten auf. Auch über die Zeit variieren die Werte stark, ohne dass eine Abhängigkeit der Behandlung mit Röntgenstrahlen erkennbar ist.

Mit Hilfe hier vorgestellter quantitativer Analysen der relativen Mengen von HSPs kann gezeigt werden, dass die ionisierende Strahlung ein Effekt auf die Menge von einigen Stressproteinen hat. Die Effekte sind in der Regel direkt nach der Strahlungseinwirkung (Tag1 bis 4) stärker und eindeutiger. Bei zwei der drei hier vorgestellten HSPs (HSP60 und HSP90 β) konnte direkt nach der Bestrahlung ein Einstieg in der Protein Abundanz aufgezeigt werden. Für spätere Zeitpunkte nach der Bestrahlung konnten keine eindeutigen Einflüsse der Strahlung auf die HSPs Proteinmenge nachgewiesen werden. Bedauerlicherweise ist die Spotzuordnung von mehreren, im Abschnitt 4.1.1 aufgeführten, identifizierten Proteinen in analytischen SYPRO Ruby Gelen nicht möglich, da hier deutlich geringere Proteinmengen elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

4.1.3 Enzymaktivität des Komplexes I der Atmungskette

Die oben vorgestellte relative Quantifizierung der Proteinmenge von einigen Proteinen der Atmungskette gibt eine Teilerkenntnis über die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Proteinzusammensetzung in Mitochondrien wieder. Die Ergebnisse über die relativen Mengen beider Komplex I Untereinheiten zeigen eine Reduzierung von Komplex I enthaltenden Superkomplexen nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy (siehe z. B. Abbildung 10). Ob diese Veränderung einen Effekt auf die Physiologie der Mitochondrien hat, hängt ebenfalls von der spezifischen Aktivität dieses Enzyms ab. Eine Änderung der Menge muss nicht zwangsläufig eine Änderung in der Gesamtaktivität des Enzyms zur Folge haben, sondern könnte durch die entgegengesetzte Veränderung der spezifischen Aktivität kompensiert werden.

Für den Aktivitätstest von Komplex I der Mitochondrien aus unbestrahlten und mit Röntgenstrahlung bestrahlten OLN-93 Zellen wurden die Proben mild solubilisiert und nativ elektrophoretisch aufgetrennt. An der Stelle soll noch darauf hingewiesen werden, dass es

sich hierbei um die identischen Proben handelt, die bei der quantitativen Proteinmengen Analyse eingesetzt wurden. Bei der Durchführung teilen sich die beiden Analysen erst nach der elektrophoretischen Auftrennung in der 1. nativen Dimension, indem BN-Spuren in die SDS Gele (2. Dimension) eingebaut, während die entsprechenden BN-Spuren in die Enzymaktivitätslösung gelegt wurden. Demzufolge wurden die Aktivitätstests genau wie die Mengenanalysen dreimal wiederholt. Wie bei der Bestimmung der relativen Menge der Proteine erfolgt bei den Aktivitätstests die Normierung auf die Zellanzahl. In eine Geltasche der 1. Dimension sind die präparierten Proben aus jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen aufgetragen worden. Die Inkubation in der Aktivitätstestlösung für Komplex I resultiert in der Bildung von Formazan-Präzipitaten in BN-Gel an den Orten, wo sich aktive Komplex I befinden. Die Formazan Bildung erfolgt durch Reduktion des Tetrazoliumsalzes nach der Oxidation von $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ durch NADH-Dehydrogenase des Komplexes I (Schafer et al., 2006). Diese Präzipitatenbildung wurde zeitabhängig densitometrisch mit Hilfe Delta2D Software analysiert. Anhand der kinetischen Auswertungen dieser Daten kann die Gesamtaktivität vom Komplex I in mitochondrialen Proben analysiert werden. In der Abbildung 35 sind beispielhaft ein Coomassie-Blue gefärbtes BN-Gel (A) und BN-Gel inkubiert in der Aktivitätslösung (B) für 90 Minuten dargestellt. Hierbei handelt es sich um die Proben aus der Röntgenstrahlung ausgesetzten OLN-93 Zellen, isolierten an verschiedenen Tagen nach der Bestrahlung. Eine BN-Gel Abbildung der unbehandelten Proben wird hier nicht gezeigt, da keine visuellen Unterschiede erkennbar sind.

Bei den mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen ist, anders als bei den mitochondrialen Proben aus Rinderherzgewebe (BHM) Proben, die eindeutige Zuordnung von den einzelnen Superkomplexbanden, sowohl in den Coomassie-Blue gefärbten, als auch in den in Komplex I Aktivitätslösung inkubierten BN-Gelen nicht möglich. Dieses stellt eine allgemeine Erschwernis bei den Proben aus Zellkultur, welches bereits bei den Analysen an humanen Fibroblasten (Frenzel, 2011) wie auch an humane Zelllinie SH-SY5Y beobachtet wurde (nicht Publizierten Daten von V. Decker). Vor allem zu Beginn der kinetischen Dokumentierung der Aktivität, aber auch bei später aufgenommenen Scans ist die eindeutige Zuordnung der Banden von einzelnen Superkomplexen nicht möglich, da diese sehr schwach und dicht beieinander im Gel vorzufinden sind. Aus diesem Grund wird bei den OLN-93 Proben ein größerer Bandenbereich, oberhalb der Lage des individuellen Komplexes I, allen Superkomplexen zugeordnet. Somit erfolgt die kinetische Auswertung der Aktivität für alle Komplex I enthaltende Superkomplexe zusammengefasst. Das heißt, dass der BN-Spur Bereich, indem alle Superkomplexe zu finden sind, als eine Einheit analysiert wird und die gesamte Komplex I Aktivität in den Superkomplexen widerspiegelt. Die

Präzipitatbande des individuellen Komplexes I kann eindeutig zugeordnet werden und wurde als die zweite separate Einheit analysiert.

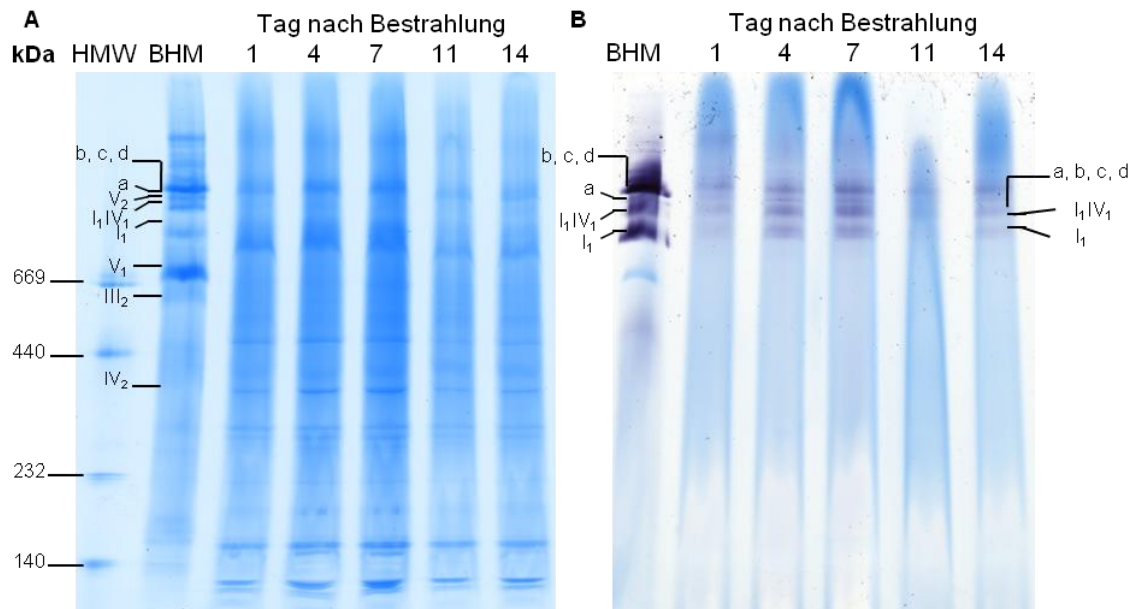


Abbildung 35: Coomassie-Blue gefärbtes BN-Gel (A) und BN-Gel inkubiert für 90 Minuten in In-Gel Aktivitätstestlösung für Komplex I (NADH-Dehydrogenase Aktivität) der Atmungskette (B) in den Proben isolierten an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung aus OLN-93 Zellen. Als sehr gut analysierte Referenz dient die mitochondriale Probe aus Rinderherzgewebe (BHM), wodurch die Bandenzuordnung erfolgt. Die Banden-Färbeintensitäten in Proben aus kultivierten Zellen sind sowohl nach Coomassie-Blue Färbung als auch nach Formazan-Präzipitatbildung im Vergleich zu BHM Proben schwach, was die eindeutige Zuordnung der Banden in den hochmolekularen Bereichen erschwert. Beschriftet sind Banden: Superkomplex a (I₁III₂), b (I₁III₂IV₁), c (I₁III₂IV₂), d (I₁III₂IV₃), I₁IV₁, Komplex V₁ (Monomer) und V₂ (Dimer), individuelle Komplexe I, III₂ und IV₂.

Durch Bestimmung der Grauwerte mittels Delta2D Software vor Inkubation und zu 8 weiteren Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 Minuten) während der Inkubation in Aktivitätslösung kann eine Kinetik der Präzipitatbildung beobachtet werden. Dabei ist die Geschwindigkeit der Bildung der Präzipitate proportional zu der Aktivität des Komplexes. Deshalb wurden gemessene absolute Grauwerte zeitabhängig dargestellt. In dem linearen Bereich der Kurve (30 bis 60 Minuten) wurde die lineare Regressionsgerade ermittelt und deren Steigung bestimmt. Die Steigung gibt die Enzymaktivität wieder, allerdings handelt es sich hierbei nicht um spezifische Enzymaktivität, sondern um die Gesamtaktivität des Enzyms, bezogen auf die Zellzahl. Ein Beispiel für die Ermittlung der Steigung, bzw. der Gesamtaktivität ist in Abbildung 36 gezeigt. Dabei handelt es sich um die Ermittlung der Gesamtaktivität vom Komplex I in den Superkomplexen für das Replikat 1 der bestrahlten Probe. Die Gesamtaktivitäten des individuellen Komplexes I und Komplexes I in Superkomplexen in allen übrigen Proben ist analog dazu bestimmt worden.

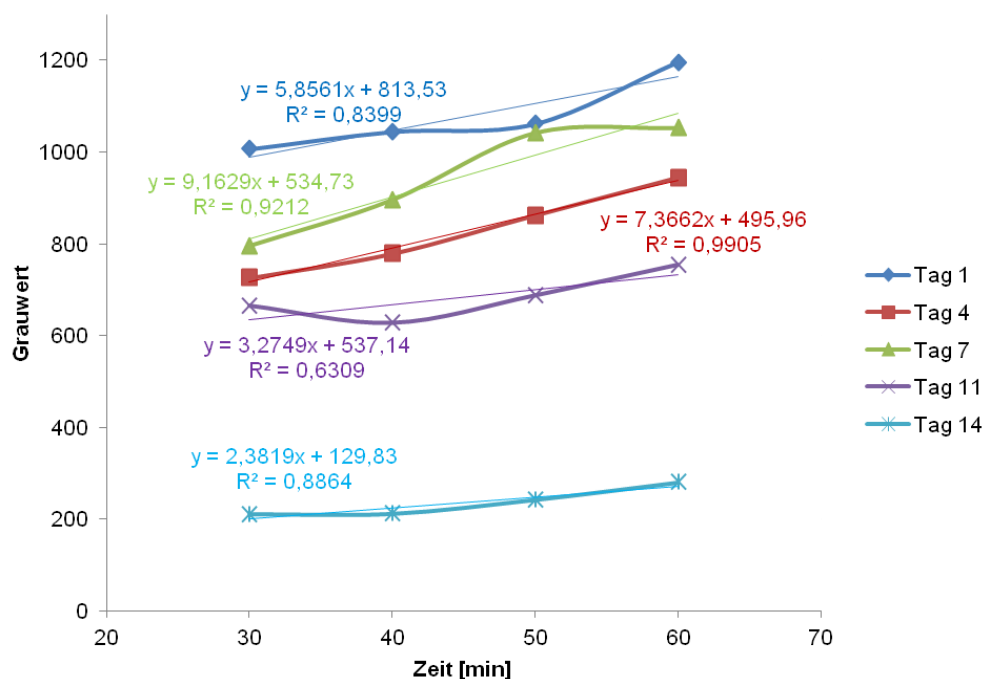


Abbildung 36: Ermittlung der Gesamtaktivität von Komplex I erfolgt anhand der Steigung der Grauwerte in der Inkubationszeit zwischen 30 bis 60 Minuten. Dargestellt als ein Beispiel ist die Bestimmung der Gesamtaktivität von Komplex I in Superkomplexen für das Replikat 1 (#1) der bestrahlten Probe. Die Auswertung von allen Aktivitätstests (auch für Komplex IV) erfolgt analog hierzu.

Die absoluten Grauwerte und somit auch die ermittelten Steigungen weichen zwischen einzelnen Experimentdurchläufen (Replikaten) sehr stark voneinander ab (siehe Anhang). Die Gründe hierfür sind nicht direkt erkennbar. Bei allen drei Experimentdurchläufen wurden die BN-Gele direkt nach der abgeschlossenen Elektrophorese in die Aktivitätstestlösungen gelegt und unter Schütteln inkubiert. Die tiefgefrorenen unbenutzten Aliquots von Aktivitätstestlösungen wurden für die Experimente aufgetaut und auf Raumtemperatur erwärmt. Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Tests über den Einfluss der Einfrierung der Aktivitätstestlösung auf die gemessene Aktivität zeigten, dass bei der hier angewandten Lösung mit Glycerin keine Effekte auftreten (Thilmany, 2013). Einziger Parameter der nicht kontrolliert wurde und somit abweichen könnte, ist die Raumtemperatur. Hierbei sind jedoch keine großen Effekte zu erwarten, da sich die Raumtemperatur kaum veränderte. Diese Unterschiede könnten vielmehr als Folge von unterschiedlichen Solubilisierungsgraden oder Isolierungseffizienten bei den drei unabhängigen Experimenten resultieren. Um die Veränderungen nach der Bestrahlung dennoch analysieren zu können, wurden die jeweiligen Steigungen der Kontrollproben auf 100 % gesetzt und die entsprechenden Steigungen der bestrahlten Proben in prozentualem Verhältnis dazu angegeben.

Mittels der beschriebenen Auswertung gewonnene Ergebnisse über die Aktivität des individuellen Komplexes I, sind in der Abbildung 37 zusammengefasst. Da es sich hierbei um einen relativen Vergleich handelt, bei dem die Proteinmenge nicht mit einbezogen wurde und die Normierung der Aktivität auf der Zellzahl erfolgt, kann hier über die relative Aktivität des Komplexes, in Bezug auf eine bestimmte Zellezahl, gesprochen werden.

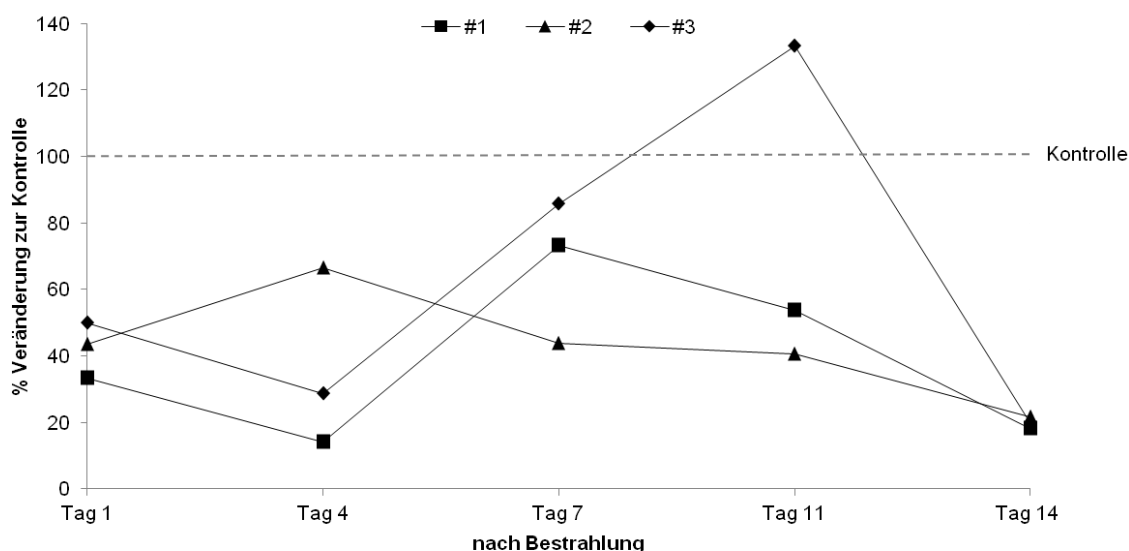


Abbildung 37: Relative Enzymaktivität vom individuellem Komplex I der Atmungskette in Röntgenstrahlung ausgesetzten (8 Gy) OLN-93 Zelle in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung im Vergleich zu der Aktivität in unbehandelten (Kontrolle) Zellen. Die Isolierung von Mitochondrien erfolgt aus je $1,5 \times 10^6$ Zellen. Bei der angewandten Methode handelt es sich um In-Gel Aktivitätstest für die NADH-Dehydrogenase Untereinheit des Komplexes. Die zeitabhängige Grauwertzunahme der Bande des individuellen Komplex I wurde mittels Delta2D Software analysiert. Anschließend fand die Ermittlung der Steigung in dem linearen Teil der Kurve (30 bis 60 Minuten nach dem Start des Experiments) statt. Die Aktivität wird anhand dieser Steigung ermittelt. Die Steigungen der entsprechenden unbehandelten (Kontroll) Proben wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Proben im prozentualen Verhältnis dazu dargestellt. Wie für die behandelten, so auch für unbehandelten Proben wurden 3 Replikate (3 unabhängige Experimente) analysiert. Die Aktivität von individuellem Komplex I wurde zu allen hier analysierten Zeiten nach der Einwirkung von Röntgenstrahlung beeinträchtigt. An Tag 11 nach der Bestrahlung zeigt allein das Replikat 3 erhöhte Aktivität im Vergleich zur unbestrahlten Probe. Alle übrigen Proben an Tag 11, sowie zu allen anderen Zeiten, zeigen deutliche Abnahmen in den relativen Aktivitäten des individuellen Komplexes I.

Die relative Aktivität des individuellen Komplex I ist, wie in der Abbildung 37 veranschaulicht, stark beeinflusst in den OLN-93 Zellen nach der Bestrahlung. Bei alle analysierten Proben, zu allen Zeitpunkten nach der Einwirkung der Röntgenstrahlung tritt eine Abnahme der relativen Aktivitäten von dem individuellen Komplex I auf. Ein Replikat (#3) an Tag 11 nach der Bestrahlung zeigt jedoch starken Anstieg der relativen Aktivität. Dieser Wert weicht von den beiden weiteren bestrahlten Proben an Tag 11 um bis über 90 % ab. Diesen Wert ausgenommen, zeigt das Diagramm zunächst einen starken Abfall der Aktivität an Tag 1 und

4 (auf ca. 40 %) nach der Bestrahlung. Im Vergleich dazu nimmt die relative Aktivität bis zu Tag 7 nach der Bestrahlung zu (ca. 70 %), um anschließend wieder bis zu Tag 14 nach der Bestrahlung auf etwa 20 % der Aktivität von unbehandelten Proben zu fallen. Bedauerlicherweise konnten bei der quantitativen Proteinmengenanalyse keine Proteinspots der Untereinheiten von dem individuellen Komplex I zugeordnet werden, wodurch der Vergleich von Änderungen in der relativen Enzymaktivität und in der relativen Proteinmenge nicht möglich ist. Die Tatsache, dass die relative enzymatische Aktivität nach der Bestrahlung abnimmt, kann viele Ursachen haben. Einerseits kann die Menge des Proteins in Röntgenstrahlung-ausgesetzten Zellen, durch Abbau oder durch Hemmung der Expression runter reguliert worden sein. Weiterhin könnte eine Inhibition der Aktivität stattgefunden haben. Die enzymatische Aktivität des Komplexes I, sowie seine Assemblierung ist unter anderem durch den sehr wichtigen cAMP/PKA Signalweg reguliert (Papa and De Rasmio, 2013). cAMP/PKA Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Zellantwort auf die durch ionisierende Strahlung induzierten Stress (Dong et al., 2014).

Die relative Aktivität von Komplex I in Superkomplexen ist in der Abbildung 38 dargestellt. Wie bereits erwähnt, handelt es sich um die Komplex I Aktivität aller Superkomplexe, da die Zuordnung einzelner Superkomplexe nicht eindeutig erfolgen kann.

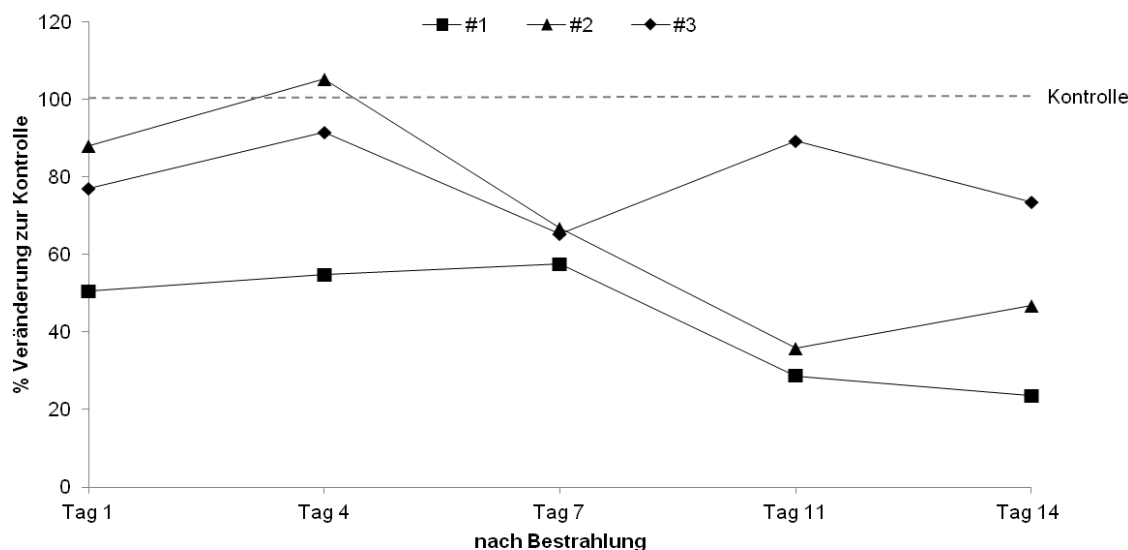


Abbildung 38: Relative Enzymaktivität des Komplexes I in allen Superkomplexen in mitochondrialen Proben aus mit ionisierender Strahlung behandelte OLN-93 Zelle, im Vergleich zu entsprechenden unbestrahlten (Kontrolle) Proben in einem Zeitraum von 14 Tagen nach der Bestrahlung. Verglichen zu den entsprechenden unbehandelten Proben (Kontrolle), ist die relative enzymatische Aktivität geringer zu allen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Allein Replik 2 an Tag 4 nach der Bestrahlung zeigt eine ca. 5 %-ige Zunahme in der Aktivität verglichen zu entsprechender Kontrolle. Wie für die behandelten, so auch für unbehandelte Proben wurden 3 Replikate (3 unabhängige Experimente) analysiert, wobei die Werte der unbehandelten Proben jeweils auf 100 % gesetzt wurden.

Aus der Abbildung 38 geht hervor, dass die relative enzymatische Aktivität des Komplexes I in Superkomplexen deutliche Verringerungen nach der Einwirkung der ionisierenden Strahlung (Röntgenstrahlung) mit einer Dosis von 8 Gy zeigt. Bis auf einen Wert an Tag 4 (#2) nach der Bestrahlung sind alle Werte, zu allen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, niedriger verglichen zu den Werten der entsprechenden unbestrahlten Proben. Die Werte der einzelnen Replikate weichen an den meisten untersuchten Tagen nach der Bestrahlung stark voneinander ab. Bei der Betrachtung von zu einem Experiment gehörigen relativen Enzymaktivitäten über die Zeit, sind die Abweichungen deutlich geringer. Die ermittelten Abnahmen der Aktivität vom Komplex I in Superkomplexen sind im Mittel geringer verglichen zu der relativen Aktivität von individuellem Komplex I. Es wurde bereits oft nachgewiesen, dass die spezifische Enzymaktivität von OxPhos-Komplexen in Superkomplexen erhöht, verglichen zu individuellen Komplexen (Dencher et al., 2007; Frenzel, 2011; Schafer et al., 2007; Schafer et al., 2006; Thilmany, 2013; Wernicke et al., 2010), ist. So z. B. wurde in dem Striatum der Ratte eine zwei- bis dreifache Erhöhung in der spezifische Enzymaktivität vom Komplex I in Superkomplexen im Vergleich zu dem individuellem Komplex gezeigt (Frenzel, 2011). Die in Rahmen meiner Arbeit ermittelte relative Gesamtenzymaktivität von individuellem Komplex I in OLN-93 ist auch um mehrfaches geringer, als die Gesamtaktivität von Komplex I in Superkomplexen (siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

Nach dem an Tag 1 nach der Bestrahlung die relative Aktivität von Komplex I in Superkomplexen auf ca. 70 % der Aktivität in unbestrahlten Proben abnimmt, zeigt sich verglichen dazu an Tag 4 nach der Bestrahlung leichter Anstieg auf ca. 85 %, gefolgt von der erneuten Senkung bis zum Tag 14 auf etwa 50 % der Aktivität in unbestrahlten Proben. Die Abbildung 38 zeigt, dass die relative Aktivität von Komplex I in Superkomplexen an Tag 11 und 14 am niedrigsten ist. Die Ursache für die Reduzierung der relativen Enzymaktivität könnte die Reduzierung von der Proteinmenge, wie auch in der Runterregulierung der spezifischen Enzymaktivität sein. Anders als für das individuelle Komplex I konnten im Rahmen dieser Arbeit für das Komplex I in Superkomplexen zwei Untereinheiten identifiziert, zugeordnet und deren relative Proteinmenge quantifiziert werden. Die relativen Proteinmengen dieser beiden Untereinheiten sind in Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellt. Dabei konnten nur für die eine der beiden Untereinheiten (NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit) die Veränderungen in der Proteinmenge beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Es zeigte sich an Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung eine Abnahme der Proteinmenge, gefolgt von einer Zunahme bis zum Tag 14 nach der Bestrahlung, verglichen zu der Proteinmenge der unbestrahlte Proben. Angesichts dieser Daten liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Veränderungen in den Proteinmengen und enzymatischen Aktivitäten direkt nach der Bestrahlung (an Tag 1 und 4) in einem direktem

Zusammenhang stehen. Diesen Angaben ist es zu entnehmen, dass als erste Reaktion auf die ionisierende Strahlung ein Abbau bzw. Hemmung der Expression von dem Protein stattgefunden haben könnte. Weiterhin könnte die Dissoziation von Komplex I enthaltenden Superkomplexen stattgefunden haben. Bei den späteren Zeitpunkten (Tag 7 bis 14) zeigte sich erhöhte relative Proteinmenge, verglichen zu den Proteinmengen in den unbestrahlten Proben, während die relative enzymatische Aktivität in bestrahlte Proben absinkt. Dieses lässt vermuten, dass für spätere Zeitpunkte nach der Bestrahlung, vielmehr die Runterregulation der spezifischen Enzymaktivität die Ursache für die hier dokumentierten Aktivitätsabnahmen sein könnte.

Zusammengefasst kann den vorgestellten Ergebnissen für Komplex I Aktivitäten sowohl in seinen individuellen, als auch in superkomplexen Formen und den Ergebnissen der Proteinmenge (siehe Abschnitt 4.1.2, z. B. Abbildung 10) entnommen werden, dass die ionisierende Strahlung starke Effekte auf die Proteinmenge, Assibilierung und auch Aktivität des Komplexes I hat. Da die Komplex I Aktivität unter Regulation von dem sehr wichtigen cAMP/PKA Signalwegs steht (Dong et al., 2014), ist dieses auch zu erwarten. Durch die In- und Aktivierung vieler Transkriptionsfaktoren steuert das cAMP/PKA Signalweg die zellulären Prozesse in physiologischen und in Stressbedingungen.

4.1.4 Enzymaktivität des Komplexes IV der Atmungskette

Analog und zeitgleich zur Analyse der relativen Aktivität des Komplexes I wurde die Aktivität von Komplex IV untersucht. Die In-Gel Aktivitätslösung für Komplex IV der Atmungskette enthält 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), welcher in der Reaktion mit Cytochrom c unter Entstehung des braunes Präzipitat in den BN-Gelorten oxidiert wird, wo sich aktiver Komplex IV befindet. Die Reaktion wird durch die Cytochrom c Oxydase Aktivität des Komplexes IV katalysiert (Schafer et al., 2006). Die Entwicklung der Präzipitatsbildung wird anhand von Scans zeitabhängig in Abständen von 10 Minuten dokumentiert und anschließend mit Hilfe Delta2D Software densitometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgt analog wie bei der Komplex I Aktivitätsanalyse, durch Auftragung der Grauwerte gegen die Zeit. Die Linearität der Zunahme von Grauwerten ist in der Zeitspanne zwischen 30 und 60 Minuten gegeben. Die errechneten Steigungen geben die Aktivität des Enzyms wieder. Die Ergebnisse sind auf die Zellzahl normiert, da pro eine Geltasche jeweils die Probe aus $1,5 \times 10^6$ Zellen auftragen wurden. Somit handelt es sich um die Gesamtaktivität des Enzyms in einer bestimmten Anzahl der Zellen.

In den Säugerzellen besteht das Komplex IV aus 13 Untereinheiten, ist ca. 200 kDa groß und liegt in der inneren mitochondrialen Membran als Homodimer vor, wie 1996 von

Tsukihara *et al.* durch die Aufklärung der Kristallstruktur rausgefunden wurden (Tsukihara *et al.*, 1996). Die enzymatische Aktivität dieses Komplexes kann durch viele Faktoren moduliert werden (Malatesta *et al.*, 1987). Dazu zählen: ATP (Acin-Perez *et al.*, 2011; Malatesta *et al.*, 1987), anorganisches Phosphat (Beauvoit and Rigoulet, 2001), Stickstoffmonoxid (Cooper and Davies, 2000), Hormone (Arnold *et al.*, 1998) und Fettsäuren (Sharpe *et al.*, 1996).

Die Abbildung 39 zeigt exemplarisch Gelbilder von unbestrahlten Proben, die parallel zu bestrahlten Proben isoliert und weiter bearbeitet wurden. Links (A) ist das BN-Gel nach der Coomassie-Blue Färbung und rechts ist BN-Gel inkubiert für 90 Minuten in Aktivitätslösung für Komplex IV (B) abgebildet. Da auch hier keine visuellen Unterschiede zwischen den BN-Gel-Abbildungen mit unbestrahlten bzw. bestrahlten Proben erkannt werden kann, wird auf weitere Gel-Abbildungen verzichtet.

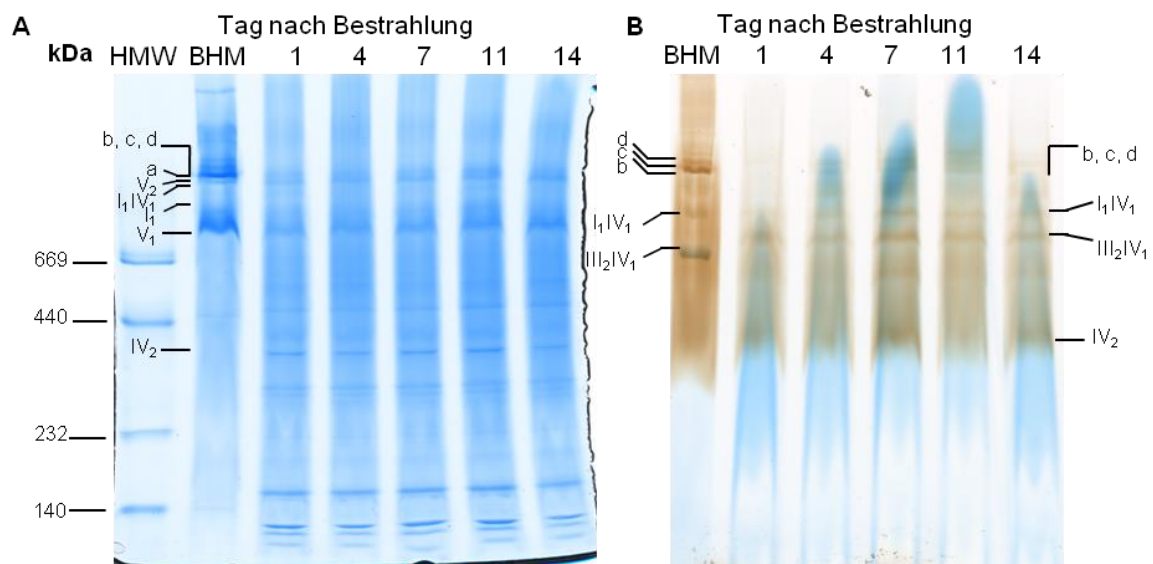


Abbildung 39: Coomassie-Blue gefärbtes BN-Gel (A) und BN-Gel inkubiert für 90 Minuten in In-Gel Aktivitätstestlösung für Komplex IV der Atmungskette (B) in den Proben isolierten an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung aus unbestrahlten (Kontrolle) OLN-93 Zellen. Als Referenz für die Bandenzuordnung wurde die mitochondriale Probe aus Rinderherzgewebe (BHM) mit auf das Gel geladen. Die Bandenintensitäten in Proben aus OLN-93 Zellen sind sowohl nach Coomassie-Färbung, als auch nach Präzipitatbildung in der Komplex IV spezifischen Reaktion, im Vergleich zu BHM Proben schwach. Aus diesem Grund ist die eindeutige Zuordnung der Superkomplexbanden, in den hochmolekularen Bereichen, erschwert. Beschriftet sind Banden: Superkomplex a (I₁III₂), b (I₁III₂IV₁), c (I₁III₂IV₂), d (I₁III₂IV₃), I₁IV₁, Komplex V₁ (Monomer) und V₂ (Dimer), individuelle Komplexe I und IV₂.

Ähnlich wie bei den BN-Gelen für Komplex I (siehe Abbildung 35) sind die Intensitäten der Banden in den Proben aus OLN-93 Zellen deutlich schwächer als in den Proben aus BHM. Deswegen sind, wie bei der Komplex I Aktivitätsanalyse, hier Banden in hochmolekularen Bereichen nur schwer zu erkennen und somit ist die eindeutige Zuordnung einzelnen Superkomplexen ausgeschlossen. Aus diesem Grund werden auch hier die relativen

Enzymaktivitäten für den individuellen Komplex IV_2 und für den Komplex IV in Superkomplexen als zwei unterschiedliche Einheiten analysiert. Dabei handelt es sich bei der Aktivität von Komplex IV in Superkomplexen um die Aktivität für alle Superkomplexe zusammengefasst. Zwischen einzelnen Experimentdurchläufen unterscheiden sich die absoluten Werte (Grauwerte) sowie Steigungen sehr stark voneinander, weshalb auch hier Darstellung der Werte anhand des prozentuellen Anteils der bestrahlten Proben, bezogen auf die Werte von entsprechenden (gleiche Experimentdurchlauf) unbestrahlten Proben, gewählt ist. Die ermittelten Steigungen sind im Anhang in Tabelle 21 und Tabelle 22 aufgelistet. Diese starken Abweichungen könnten aus, zu verschiedenen Zeiten, durchgeführten Experimenten resultieren. Dabei kann die Solubilisierungseffizienz besonders starken Einfluss auf die gemessenen Werte ausgeübt haben. Bei diesen Experimenten wurde stets der Wert auf die exakte Durchführung, sowie auf die Anwendung von gleichen Chemikalien und Lösungen gelegt, dennoch sind einige Aufarbeitungsschritte, wie z. B. Solubilisierung von Membranproteinen möglichst parallel durchzuführen um zweifelfrei verglichen werden zu können.

Die relative Enzymaktivität des individuellen Komplex IV_2 in mitochondrialen Proben aus OLN-93 Zellen ist in der Abbildung 40 dargestellt.

Die ionisierende Strahlung mit einer Dosis von 8 Gy hat starken Einfluss auf die Aktivität von individuellem Komplex IV_2 . Während an Tag 4, 7 und 14 eine deutliche Erhöhung der relativen Aktivität auf ca. 116 % bis ca. 300 % der unbestrahlten Proben beobachtet wird, sinkt diese an Tag 11 auf etwa 50 % bis 85 %. Die ermittelten Werte an Tag 1 nach der Bestrahlung lassen keinen Rückschluss über die Veränderungen der enzymatischen Aktivität des Komplexes zu. Abgesehen von breiter Abweichung der Werte, liegen diese sowohl unterhalb, als auch oberhalb der Werte von unbestrahlten Proben.

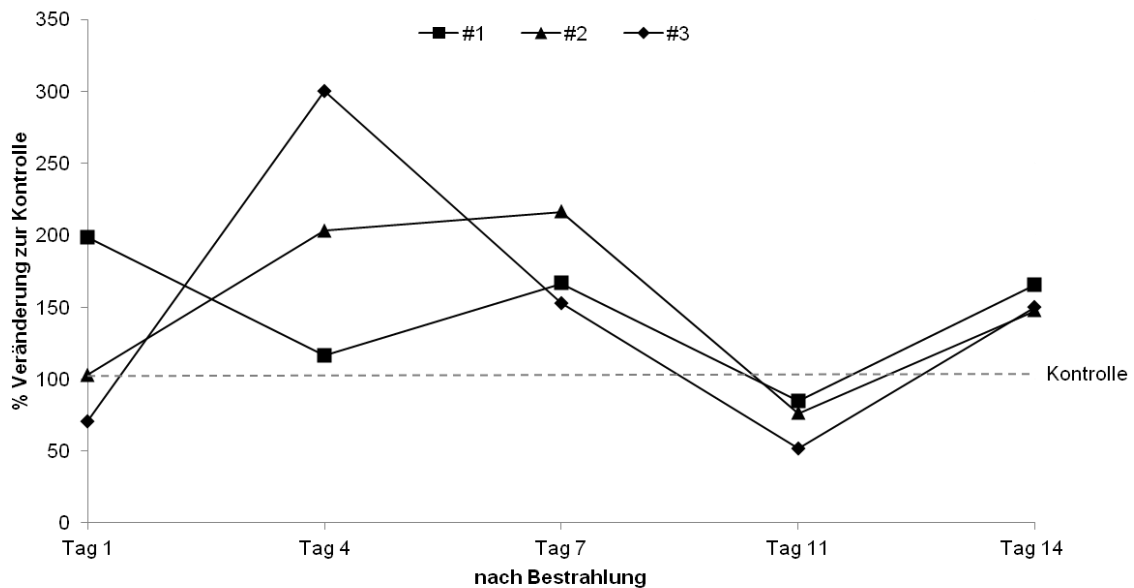


Abbildung 40: Relative Enzymaktivität des individuellen Komplexes IV₂ in mitochondrialen Proben aus Röntgenstrahlung-ausgesetzten (8 Gy) OLN-93 Zellen im Verhältnis zur Aktivität in Proben aus unbestrahlten (Kontrolle) Zellen. Dabei wurde der Effekt der Bestrahlung an Tag 1, 4, 7, 11 und 14 nach der Bestrahlung untersucht. Das Experiment ist 3 Mal wiederholt worden und die Werte eines Experimentdurchlaufs sind in prozentuellem Verhältnis dargestellt. Die relative Aktivität der entsprechenden unbestrahlten Proben ist stets auf 100 % gesetzt. Die Werte der relativen Aktivität zwischen einzelnen Replikaten der bestrahlten Proben weichen zum Teil stark voneinander ab. An Tag 4, 7 und 14 nach der Bestrahlung kann eine sichtliche Erhöhung der relativen Aktivität von individuellem Komplex IV₂, verglichen zu unbestrahlten Proben, beobachtet werden. Dagegen kann an Tag 11 nach der Bestrahlung eine Abnahme der Aktivität gesehen werden. Die drei Replikate an Tag 1 nach der Bestrahlung geben keine Rückschlüsse über die Bestrahlungseffekte auf die Aktivität des Komplexes IV₂. Hier belaufen sich die Werte zwischen 70 % und 200 % den Werten von unbestrahlten Proben.

Im Rahmen der quantitativen Analyse der Proteinmenge konnten keine Untereinheiten vom individuellen Komplex IV analysiert werden. Aus diesem Grund kann die Veränderung der Proteinmenge als eventuelle Ursache, genauso wie regulatorische Faktoren, angenommen werden. Da es sich hierbei um zum Teil starke Erhöhungen der Aktivität des Komplexes handelt, kann vermutet werden, dass die Ursache sowohl in den Erhöhungen der Proteinmenge, als auch in der Aktivierung der spezifischen Enzymaktivität durch regulatorische Effektoren liegt. So z. B. kann durch die spezifische Phosphorylierungen die allosterische Hemmung von Komplex IV durch ATP verhindert werden, wodurch die Komplex IV Aktivität erhöht wird (Acin-Perez et al., 2011). Komplex IV katalysiert den einzigen irreversiblen und letzten Schritt der Atmungskette und stellt eine der wichtigsten Kontrollpunkte des gesamten Prozesses dar (Kadenbach, 1986). Aus diesem Grund kann die Aktivität dieses Komplexes einerseits sehr schnell moduliert werden, durch z. B. Änderungen in der Substrataffinität des Komplexes zu Cytochrom c. Andererseits können die langfristigen Modulationen der Aktivität durch die Expressionskontrolle der einzelnen

Untereinheiten erfolgen. Die an Tag 11 beobachtete Senkung der Aktivität des Komplexes IV ist, verglichen zu Kontrollproben, gefolgt von einem erneuten Anstieg. Diese eher kurzfristige Modulation der Aktivität, ist wahrscheinlich durch die schnelle regulatorische Aktionen bewerkstelligt.

Die Ergebnisse über die relativen Aktivitäten von Komplex IV in Superkomplexen in den Proben aus bestrahlten OLN-93 Zellen, im Vergleich zu Proben aus unbestrahlten Zellen, sind in der Abbildung 41 grafisch zusammengefasst.

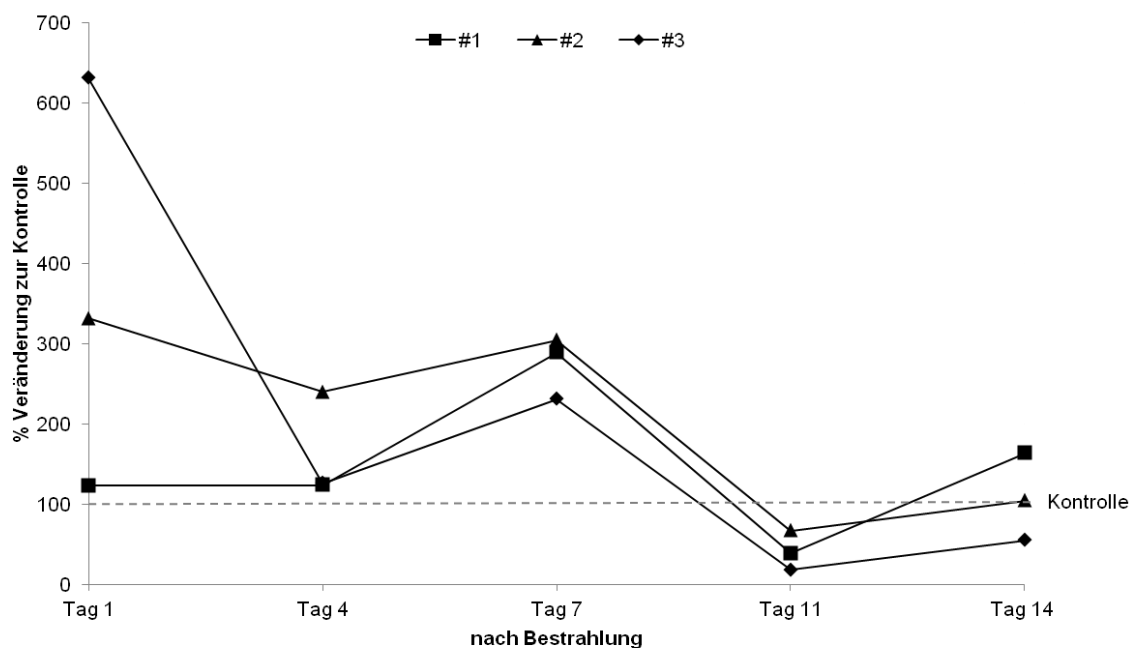


Abbildung 41: Relative Aktivität vom Komplex IV in Superkomplexen in den Proben aus mit Röntgenstrahlung bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen im Vergleich zu der relativen Aktivität in den Kontrollproben. An Tag 1, 4 und 7 kann ein Anstieg der Aktivität des Komplexes IV in Superkomplexen beobachtet werden. An Tag 11 sinkt die relative Aktivität auf die Werte zwischen ca. 20 % und ca. 70 %. An Tag 14 nach der Bestrahlung können keine Änderungen in der Aktivität beobachtet werden. Sowohl für bestrahlten, als auch für unbestrahlten Proben wurden 3 Replikate (3 unabhängige Experimente) ausgewertet. Die Werte für entsprechende unbestrahlte Proben sind jeweils auf 100 % gesetzt und die dazugehörige bestrahlte Probe in dem prozentuellen Verhältnis dargestellt.

In BHM-mitochondriale Proben sind in Komplex IV enthaltenden Superkomplexen b ($I_1III_2IV_1$), c ($I_1III_2IV_2$), d ($I_1III_2IV_3$) und I_1IV_1 zu sehen. Da die Zuordnung der einzelnen Superkomplexe in den Proben aus OLN-93 Zellen nicht mit großer Sicherheit erfolgen kann, wird die relative Aktivität in allen Superkomplexen zusammengefasst analysiert. Wie für den individuellen Komplex IV konnte im Rahmen der quantitativen Analyse zu der relativen Proteinmenge keine Komplex IV Untereinheit aus Superkomplexen analysiert werden.

Die Abbildung 41 zeigt, dass die drei Replikate der bestrahlten Probe sehr stark voneinander abweichen. Am extremsten zeigt sich dieses an Tag 1 nach der Bestrahlung, wo ein Wert bei ca. 630 % der unbestrahlten Probe liegt, während der niedrigste Wert nur etwa 120 % erreicht. Da es sich bei diesem Experiment um keine absoluten Vergleiche handelt und nicht die spezifische enzymatische Aktivität analysiert ist, kann man nur über die Tendenzen der Veränderungen sprechen, welche aber eindeutig erkennbar sind. Deshalb wird die tatsächliche quantitative Veränderung nicht mit großen Gewichten in die Interpretation der Daten mit einbezogen. Eine tendenzielle Zunahme der relativen Aktivität des Komplexes IV in Superkomplexen tritt an Tag 1, 4 und 7 nach der Bestrahlung auf. Differenziert ist es an Tag 11 nach der Bestrahlung, wo die relative Aktivität des Komplexes IV in Superkomplexen, verglichen zu Kontrollprobe, abnimmt. An Tag 14 nach der Bestrahlung ist die Aktivität von unbestrahlten und bestrahlten Proben gleich.

Die hier beobachteten Veränderungen der Aktivität von Komplex IV in Superkomplexen können anhand gelieferter Informationen molekular nicht erklärt werden. Die hier zu sehenden Effekte könnten, wie bereits in dem Zusammenhang mit der Aktivität des individuellen Komplex IV gesagt, sowohl durch die Expression, bzw. Abbau des Proteins, als auch durch die regulatorischen Prozesse auf die spezifische Enzymaktivität hervorgerufen werden.

Vergleicht man die relative Aktivität des individuellen Komplexes IV₂ mit der Aktivität von Komplex IV in Superkomplexen, so kann erkannt werden, dass hier ähnliche Regulation über die Zeit nach der Bestrahlung gegeben ist. So zeigen die Analysen der Aktivität von individuellem, wie auch von Komplex IV in Superkomplexen zunächst eine Erhöhung der Aktivität gegenüber der Aktivität in unbestrahlten Proben, gefolgt von einer Reduzierung der Aktivität an Tag 11 nach der Bestrahlung. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass die enzymatische Aktivität des individuellen Komplexes IV₂ wie auch von Komplex IV in Superkomplexen ähnlich reguliert wird. Weiterhin kann anhand der in Anhang aufgelisteten Daten (siehe Tabelle 21 und Tabelle 22) erkannt werden, dass die gesamte Enzymaktivität von Komplex IV in unbestrahlten und in bestrahlten OLN-93 Zellen in individueller Form wie auch in Superkomplexen vergleichbar ist. Aus den Arbeiten von Schäfer et al. an Rinderherzmitochondrien (Schäfer et al., 2006), von Frenzel et al., wie auch von Thilmany an Rattenhirn (Frenzel et al., 2010; Thilmany, 2013) und von Muschol an *Podospora anserina* (Muschol, 2014) geht eine gesteigerte spezifische Aktivität des Komplexes IV in den Superkomplexen, gegenüber individueller Form bis zum Faktor 30 hervor. Demnach könnte sich in OLN-93 Zellen eine deutlich größere Menge von individuellem Komplex IV₂ verglichen zu der Menge von assembliertem Komplex IV befinden.

Des Weiteren ist es interessant zu beobachten, dass die Aktivitäten von Komplex IV und Komplex I nach der Einwirkung der ionisierenden Strahlung entgegengesetzt reguliert sind. Während durch die Bestrahlung die relative Aktivität von Komplex I in individueller Form und in Superkomplexen reduziert wird, erhöht sich diese, abgesehen von der Aktivität an Tag 11 nach der Bestrahlung, für die Komplex IV. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die zelluläre Antwort auf den durch die ionisierende Strahlung induzierter Stress unterschiedlich für die einzelnen Komplexe der Atmungskette ist. Ähnliche Effekte bezüglich der enzymatischen Aktivität der Atmungskettenkomplexe wurden bereits im Zusammenhang mit diversen pathologischen Veränderungen beschrieben. So z. B. wurde eine Reduzierung der Aktivität des Komplexes IV und II und unbeeinflusste Aktivität des Komplexes I bei der Huntington-Krankheit beobachtet (Damiano et al., 2010). Ähnlich konnte im Zusammenhang mit Alzheimer Demenz in einer Studie mit β -Amyloidem Peptid 25-35 selektive Runterregulation von Komplex IV Aktivität gezeigt werden (Canevari et al., 1999).

4.2 Membran-analytische Untersuchungen von Strahlungseffekten

Biologische Membranen stellen die selektiven Barrieren für viele Moleküle dar. Somit dienen die Membranen einerseits als Abgrenzung zwischen den Zellen und andererseits schaffen sie funktionsspezifische intrazelluläre Kompartimente. Im Modell können die Membranen als flüssig-kristalline Strukturen beschrieben werden (Singer and Nicolson, 1972). Das bedeute, dass die Membranen keine starren Strukturen darstellen, sondern die Lipide und Proteine sich in der Membran in Bewegung befinden. Die Bewegungsarten der Membranbestandteile sind das laterales Diffundieren, Rotieren, sowie Transversale Bewegungen. Die biologischen Membranen unterscheiden sich zum einem in dem Protein-Lipid-Verhältnis und zum anderem in der Lipid-, bzw. Proteinzusammensetzung. Diese Unterschiede variieren stark und beeinflussen die Membraneigenschaften. Die meisten membranspezifischen Funktionen wie Transport, Kommunikation, Weiterleitung der Signale oder Energieübertragung üben die verschiedenen in den Membranen integrierten Proteine aus. Treten die Änderungen oder Schädigungen in den biologischen Membranen auf, können die wichtigen zellulären Prozesse beeinflusst werden.

Durch ionisierende Strahlung können direkte Schäden wie an den DNA-, so auch an Lipid- und Proteinmolekülen entstehen. Allerdings entstehen die meisten Schäden durch indirekte (sekundäre) Einwirkung. Die Zelle besteht zu einem hohen Anteil aus Wasser, welches durch die Radiolyse in ROS umgewandelt wird. Aus Wasser entstandenes ROS kann wiederum Schäden an den Biomolekülen verursachen (Park et al., 2005). Neben dem Wassergehalt spielt dabei noch der Sauerstoffgehalt in den Zellen eine wichtige Rolle. Bekanntlich stellen hypoxischen Tumorkerne bei der Therapie des soliden Tumors Probleme dar (Adams et al., 1997; Harris, 2002). Dabei spielen durch Sauerstoffmangel aktivierte Signalwege und veränderte ROS-Mengen wichtigste Rollen (Cairns et al., 2011; Cui, 2012; Klimova et al., 2009; Pappova et al., 1982; Tominaga et al., 2004).

Um einen ersten Einblick in die Auswirkung der ionisierenden Strahlung mit einer Dosis von 8 Gy auf die Membranen zu bekommen, wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Experimente bezüglich der Membrananalysen durchgeführt. Zum Einem wurde die Fluidität der mitochondrialen Membranen mit Hilfe der Fluoreszenz-Anisotropie der in Membranen angelagerte Fluoreszenzsonde in der 14-tägigen Zeitspanne nach Bestrahlung analysiert. Weiterhin war von Interesse zu untersuchen, ob die Fluidität der Zellmembran von OLN-93 Zellen nach der Einwirkung der Röntgenstrahlung verändert wurde. Um die Rolle des Sauerstoffgehaltes in der Zellantwort auf den durch ionisierender Strahlung induziertes Stress analysieren zu können, wurde die Fluidität der mitochondrialen Membran auch an Proben aus mit CoCl_2 behandelten OLN-93 Zellen durchgeführt. CoCl_2 wird oft als Hypoxie-

Nachahmer beschrieben, da dieser in den Zellen zur Aktivierung von HIF-1 Signalwegs führt (Ardyanto et al., 2006; Chachami et al., 2004; Lee et al., 2013). Weitere Analysen bezogen sich auf die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von CoCl_2 bzw. von der Behandlung mit Röntgenstrahlung. Die Messungen der Fluoreszenzanisotropie wurden von Frau Steffanie Kern durchgeführt. Die Analyse der Lipidzusammensetzung mittels MALDI-TOF ist ein Produkt der Zusammenarbeit mit Frau Steffanie Kern und Frau Christine Kern. Die Daten der Lipidanalysen sind bereits in ihren Masterarbeiten beschrieben (Kern, 2013a; Kern, 2013b).

4.2.1 Analyse der Membranfluidität mittels Fluoreszenz-Anisotropie

Der Begriff „Membranfluidität“ wird in der Literatur weit verbreitet angewendet. Mit diesem nicht-physikalischen Begriff werden Dynamik und Ordnungszustand der Membran beschrieben.

Denkt man an die Zellteilung, Abschnürung von Membranvesikeln bei der Endo- und Exozytose, sowie an Teilung von Zellorganellen, so gewinnt die Wichtigkeit der Fluidität der Biomembranen an der Bedeutung. Insbesondere bei Mitochondrien, die in vielen Zelltypen ein dynamisches Netzwerk darstellen, spielt die Membranfluidität große Rolle. Die Änderungen der Membranfluidität beeinflussen diese und weitere wichtige zelluläre Prozesse, wie auch die Membranpermeabilität und die Funktionen in der Membran eingelagerte Proteine. Die Fluidität der Membran ist außer von Temperatur auch von der Protein- und Lipidzusammensetzung abhängig. Höher Fluidität besitzen Membranen mit Lipiden aufgebauten aus kurzen ungesättigten Fettsäuren. Umgekehrt nimmt die Fluidität mit zunehmendem Sättigungsgrad und zunehmende Fettsäuren-Längen ab (Brown, 2002). Ein der Wichtigsten Regulatoren der Fluidität stellt das Cholesterol dar. Die meisten Lipide besitzen relative niedrige Phasenübergangstemperatur, T_m (unterhalb starrer, gelartiger „kristalliner“ Zustand, oberhalb „flüssig-kristalliner“ Zustand). Das Cholesterol lagert sich zwischen Fettsäuren der Lipide ein. Durch die Einlagerung wirkt Cholesterol bei den Temperaturen unterhalb T_m entgegen dem Phasenübergang zu dem gelartigen „kristalline“ Zustand. Andererseits bei den Temperaturen oberhalb T_m mindert es die Beweglichkeit der Lipide.

Wie und ob sich die durch ionisierende Strahlung verursachten Schädigungen in den Biomembranen auf die Fluiditätseigenschaften auswirkten, wird in diesem Abschnitt präsentiert. Die angewandte Methode für die Analysen der Membranfluidität ist „steady state“ Fluoreszenz-Anisotropie. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass sich bestimmte Fluoreszenzsonden in der Membran einlagern. Nach der Anregung der Sonden mit linear

polarisiertem Licht, misst man die Polarisation des emittierten Lichts. Die Anisotropie lässt sich aus Polarisation berechnen. Wobei beider Begriffe die Richtungsabhängigkeit der Emission beschreiben und beide sich gegenüber der Beweglichkeit der Moleküle in der Membran, bzw. der Fluidität der Membran umgekehrt proportional verhalten (Dencher, 1990; Lentz, 1993).

4.2.1.1 Effekt von ionisierender Strahlung auf die mitochondrialen Membranfluidität in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung

Die Fluoreszenz-Anisotropie in intakten mitochondrialen Proben, isoliert wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben, aus unbehandelten und mit Röntgenstrahlung (8 Gy) behandelten OLN-93 Zellen wurde unter Einsetzen von DPH Fluoreszenzsonde am PTI Spektrometer bestimmt. Der besondere Vorteil dieser Methode ist die erforderliche niedrige Probemenge, die es ermöglicht das Experiment mit genügender Anzahl der Replikate durchzuführen. Die notwendige Probemenge wurde durch die Vorversuche anhand der nach Bradford bestimmten Proteinkonzentration der Probe festgelegt. Diese wie auch weitere Vorversuche zur Verifizierung und Optimierung der Methode sind in der Masterarbeit von der Frau Steffanie Kern beschrieben (Kern, 2013b).

Die Abbildung 42 zeigt die Fluoreszenz-Anisotropie der Fluoreszenzsonde in den mitochondrialen Membranen, abhängig von der Zeit nach der Bestrahlung im Vergleich zu Proben aus unbestrahlten Zellen. Für jede Probe wurden zehn Replikaten vermessen. In der Grafik sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aufgeführt.

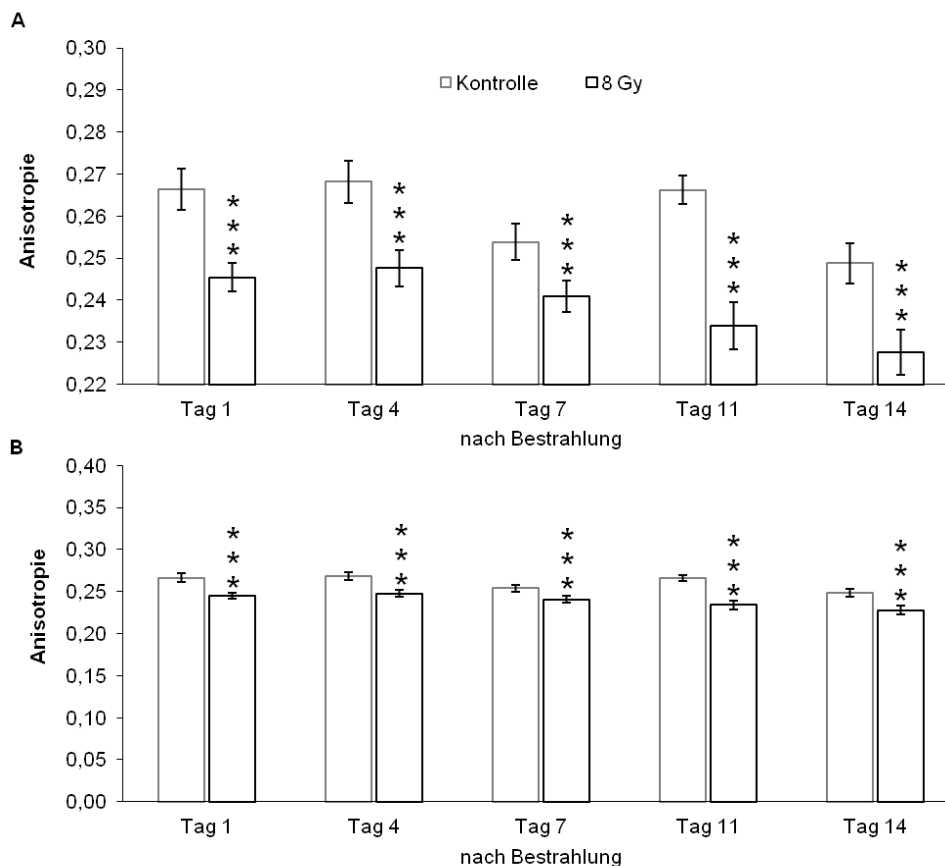


Abbildung 42: Fluoreszenz-Anisotropie von DPH Sonde in den mitochondrialen Membranen in der Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (8Gy). Als Kontrollproben wurden zu identischen Zeiten die Mitochondrien aus unbestrahlten Zellen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessene Werte (n=10) mit Standardabweichungen. Grafiken A und B stellen die gleichen Daten dar und unterscheiden sich in gezeigtem Abschnitt der Anisotropie-Werten (y-Achse). B zeigt den gesamten theoretischen Bereich, den die Anisotropie-Werte für DPH Fluoreszenzsonde einnehmen können (0,0 bis 0,4) Zur allen Zeitpunkten nach der Bestrahlung kann eine Abnahme der Anisotropie gesehen werden. Die Unterschiede sind statistisch höchst signifikant (***) p-Wert < 0,001; t-Test).

Aus der vorliegenden Grafik kann entnommen werden, dass die Anisotropie von DPH in der mitochondrialen Membranen aus dem Röntgenstrahlung ausgesetzten Zellen verringert wird, verglichen zur Kontrolle. Die Abnahmen der Anisotropie treten zu allen analysierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung auf. Über die Zeit kann in bestrahlten Proben fasst eine geringe kontinuierliche lineare Abnahme der Anisotropie beobachtet werden. Am niedrigsten sind die Anisotropie-Werte in bestrahlten Proben an Tag 11 und 14 nach der Bestrahlung. Dagegen sind die Veränderungen der Anisotropie bei unbestrahlten Proben über die Zeit deutlich geringer. Im Durchschnitt nehmen die Anisotropie-Werte zu allen analysierten Zeiten um ca. 0,02 ab. Wie bereits gesagt, steht die Anisotropie in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zu Fluidität der Membran. Das bedeutet, dass die

ionisierende Strahlung die Fluidität der mitochondrialen Membranen erhöht. Da die erhöhte Fluidität der Membran mit erhöhter Membranpermeabilität und erhöhter Beweglichkeit der Membranproteine und Lipide korreliert (Lande et al., 1995), kann das für die mitochondrialen, sowie zelluläre Funktionalität negative Folgen haben. Denkt man an die Mitochondrien als Speicherort für Ca^{2+} , welcher bei der Anleitung der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Brookes and Darley-Usmar, 2004) oder an den über die innere mitochondrialen Membran aufgebauten elektrochemischen Protongradient, so wird die Bedeutung der Aufrechterhaltung von physikalischen Membraneigenschaften klar. Es ist wahrscheinlich, dass selbst kleinere Veränderungen in der Fluidität der Membranen einen Einfluss auf die zellulären und mitochondrialen Prozesse haben. Die physiologische Relevanz der in Abbildung 42 dargestellten Daten kann veranschaulicht werden durch folgenden Beispiele: Eine solcher Abnahme der Anisotropie-Werte von DPH Sonde in der Membran (um 0,02) wird durch die 2,5 %-ige Abnahme der Cholesterol-Menge (Cholesterol- zu Gesamtlipid-Menge) erreicht (Kern, 2013b). Sugawa et al. zeigten in eine Studie zur Analyse der Membranfluidität im Alterungsprozess eine alterungsabhängige (jung zu alt) Erhöhung der Anisotropie-Werte von DPH Sonde in der Membran um 0,01 (Sugawa et al., 1996).

Aus diesen Informationen kann man schlussfolgern, dass die durch die ionisierende Strahlung und durch die Akkumulation von ROS (Radiolyse der Wassermoleküle) hervorgerufene Peroxidationen von Lipiden, sowie oxidativen Schädigungen von Membranproteinen die Fluiditätseigenschaften der mitochondrialen Membranen beeinflusst. Desweiteren kann aus den vorgestellten Daten ersehen werden, dass die Veränderungen nicht mit der Zeit nach der Bestrahlung reduziert werden, sondern die Erhöhung der Membranfluidität innerhalb von 14 Tagen nach der Bestrahlung geringfügig weiter zunimmt. Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung könnte sein, dass das mitochondriale antioxydative System nicht die stark erhöhte ROS-induzierten Schäden kontrollieren kann, wodurch die Schädigungen der Membranen längere Zeit nach der Bestrahlung weiter erfolgen, bzw. bestehen bleiben. Weiterhin könnte das antioxydative System durch die Einwirkung von ionisierender Strahlung beschädigt werden, wodurch dessen Funktionen beeinträchtigt sein könnten. Ebenfalls könnten die strahlungsinduzierte mitochondriale Dysfunktionen eine dauerhafte Erhöhung der endogene ROS-Produktion bewirkt haben (Kam and Banati, 2013), wodurch die Schädigungen der Membranen wie auch anderen Zellkomponenten längere Zeit nach der Aussetzung der Röntgenstrahlung erfolgen könnten. Um weitere Aufschlüsse über die Änderungen der Fluidität der mitochondrialen Membranen zu bekommen, kann für die Weiterführung des Projekts die Durchführung einer Langzeitstudie in diesem Zusammenhang empfohlen werden.

4.2.1.2 Effekt der ionisierender Strahlung auf die Fluidität der Zellmembran

Um zu testen ob die ionisierende Strahlung im gleichen Maßen die deutlich Cholesterinreichere Zellmembran (Liscum and Munn, 1999) verändert, wurden die Anisotropiemessungen auch an intakten OLN-93 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden exemplarisch nur die Zellen am Tag 1 nach der Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Zellen analysiert. In diesem Fall wurden zwei unabhängige Messungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzsonden durchgeführt. Die DPH Sonde lagert sich auf Grund ihre starke Lipophilie tief in der Membran zwischen den Fettsäureresten ein (Shinitzky and Barenholz, 1978). Die zweite eingesetzte Fluoreszenzsonde, TMA-DPH, ist deutlich amphiphil und ragt in die Membran-Fettsäurereste nicht so tief wie DPH. Außerdem wechselwirkt TMA-DPH durch seine kationischen Eigenschaften mit der anionischen Oberfläche der zytosolische Membran (Kaiser and London, 1998; Prendergast et al., 1981).

Die Abbildung 43 zeigt die Anisotropie von DPH in Zellmembran an intakten OLN-93 Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkung der Röntgenstrahlung mit Dosis von 8 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte gebildet aus einer Messreihe mit zehn Replikaten und dazugehörige Standardabweichungen.

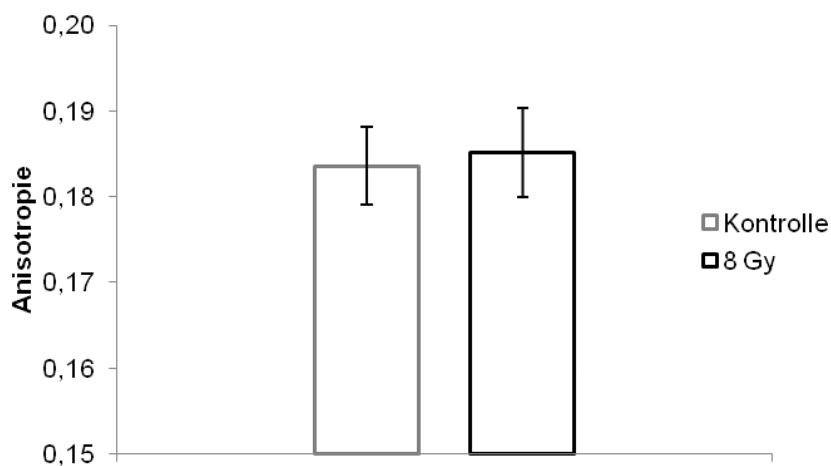


Abbildung 43: Effekt von ionisierender Strahlung (8 Gy) auf die Fluoreszenz-Anisotropie von DPH in den OLN-93 Zellmembranen. Als Kontrolle ist die Anisotropie in unbehandelten Zellen analysiert. Die dargestellte Werte repräsentieren Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen. Es können keine Unterschiede in der Fluoreszenz-Anisotropie zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben beobachtet werden.

Die Abbildung 43 zeigt, dass die Fluoreszenz-Anisotropie von DPH Sonde in der Zellmembran nach der Einwirkung von Röntgenstrahl sich nicht ändert. Das bedeutet, dass die ionisierende Strahlung keinen Effekt auf die Membranfluidität hat. Weiterhin kann man

aus der Grafik ablesen, dass die Anisotropie Werte für die Zellmembran im Vergleich zu Anisotropie-Werte der mitochondrialen Membranen (siehe Abbildung 42) deutlich niedriger sind. Das bedeutet, dass die mitochondrialen Membranen weniger fluid als die Zellmembran (siehe Abbildung 42) sind. Eine Ursache für diese Beobachtung kann an der Protein- und Lipidzusammensetzung der beiden Membransysteme liegen. Dabei spielt mit Sicherheit der Sättigungsgrad der Fettsäuren der Lipide große Rolle.

Die Fluoreszenz-Anisotropie von TMA-DPH Sonde in der Zellmembran an intakten OLN-93 Zellen ist in der Abbildung 44 grafisch dargestellt. Da die kationische TMA-DPH Sonde mit anionischer Oberfläche der Zellmembran wechselwirkt und dadurch in ihrem Bewegungsverhalten eingeschränkt ist, sind hier etwas höhere Anisotropie-Werte, als bei der DPH Fluoreszenzsonde zu erwarten. Die aufgeführten Daten stellen die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=10) dar.

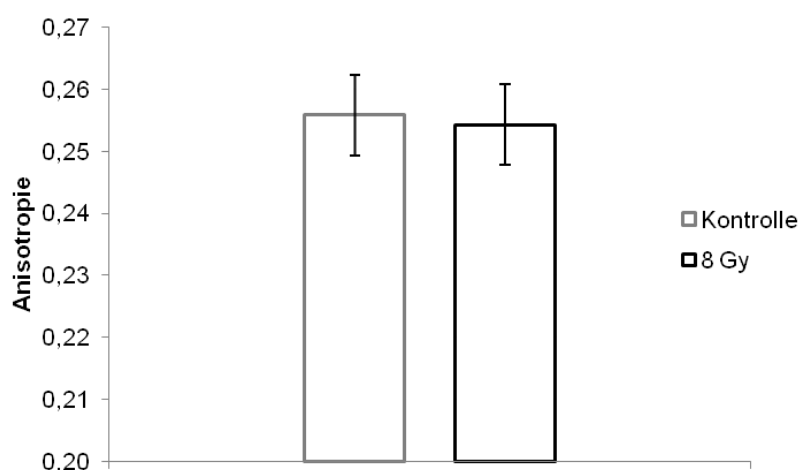


Abbildung 44: Anisotropie der TMA-DPH Fluoreszenzsonde in der Zellmembran von intakten unbehandelten und Röntgenstrahlung ausgesetzten OLN-93 Zellen. Die dargestellten Werte stellen die Mittelwerte (n=10) mit Standardabweichungen. Die Fluoreszenz-Anisotropie in der Zellmembran ändert sich nicht nach der Bestrahlung.

Analog zu der in Abbildung 43 dargestellte Fluoreszenz-Anisotropie der DPH Sonde kann auch hier kein Effekt der Bestrahlung auf die Anisotropie von TMA-DPH und somit auf die Fluidität der Zellmembran erkannt werden. Weiterhin kann im Vergleich zu DPH hier die erwartete höhere Anisotropie beobachtet werden. Die Anisotropie-Analysen der Zellmembran an intakten OLN-93 Zellen mit beiden Fluoreszenzsonden untermauern sich gegenseitig.

Zusammengefasst kann gezeigt werden, dass eine Veränderung der Membranfluidität als Folge der Einwirkung von Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 8 Gy nicht bei der

Zellmembran auftritt. Dagegen ist die Membranfluidität der mitochondrialen Membranen davon betroffen. Ob diese Änderungen für mitochondrialen Membranen spezifisch, oder ob weitere intrazelluläre Membransysteme betroffen sind, kann an Hand dieser Ergebnisse nicht ersehen werden. Die Änderungen der Membranfluidität von mitochondrialen Membranen kann Einfluss auf wichtige Funktionen der Mitochondrien haben. So z. B. kann die oxidative Phosphorylierung und somit die Synthese von ATP durch Abnahme des elektrochemischen Potentials über die innere Membran oder durch funktionelle Veränderungen der OxPhos-Enzyme beeinflusst werden. Weiterhin können die Signalkaskaden wie z. B. Auslösung von intrinsischer Apoptose durch die erhöhte Fluidität der mitochondrialen Membranen aktiviert werden.

4.2.1.3 Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Fluidität der mitochondrialen Membranen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl_2

Der Sauerstoffgehalt spielt bei der zellularen Antwort auf die ionisierende Strahlung eine wichtige Rolle. Im Zusammenhang mit der Tumor-Pathologie stellt der Sauerstoffgehalt einen der wichtigsten Schlüsselfaktoren bei der Prolongation des Tumors, sowie bei der Strahlentherapie dar (Adams et al., 1997; Cui, 2012; Harris, 2002; Lyng et al., 2000). Der durch Sauerstoffmangel stabilisierter Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert unter anderem die Angiogenese, Erythropoese und Glykolyse (Lee et al., 2004) wodurch Tumorstadium und Metastasenbildung gefördert werden. Außerdem beteiligt sich HIF-1 an der Zellzykluskontrolle und Unterdrückung der Apoptose (Lee et al., 2004), was die Therapieresistenz zu Folge haben kann. Dieses beschreibt nur einen Teil der sehr komplexen Reaktionen der Zelle auf die hypoxische Bedingung. Eine ähnlicher Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 auf zellulärer Ebene wurde nach der Behandlung von Zellen mit CoCl_2 beobachtet (Lee et al., 2013). In einigen Studien spricht man beim Behandlungen von Zellen mit CoCl_2 sogar von „Hypoxie-Imitator“-Bedingung (Ardyanto et al., 2006; Chachami et al., 2004; Lee et al., 2013).

In Rahmen meiner Arbeit wurden die Effekte der ionisierenden Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy auf OLN-93 Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen mit CoCl_2 untersucht. Diese Tests sollten der erste Einblick in die mitochondrialen Zellantwort auf die Hypoxie-nachahmende Bedingung liefern und die hypoxie-nachahmende Eigenschaften dieser Methode testen. Unter anderem wurden die Untersuchungen bezüglich der Fluidität der mitochondrialen Membranen mit Hilfe Fluoreszenz-Anisotropie der Fluoreszenzsonde DPH durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit der CoCl_2 erfolgte durch Zugabe des

CoCl₂ in das Nährmedium in einer Endkonzentration von 300 µM. Die Zellen wurden jeweils für mindestens 48 Stunden in CoCl₂-haltigem Medium kultiviert bevor diese der Röntgenstrahlung (8 Gy) ausgesetzt waren, um sich an die Bedingungen anpassen zu können. Hiermit sollte den Zellen die Zeit für die Umregulierung von zellulären Prozessen durch den HIF-1 Transkriptionsfaktor gegeben werden. Die Analyse des Effekts von CoCl₂ und ionisierender Strahlung erfolgte im Vergleich zu unbehandelten, nur mit CoCl₂ behandelten und nur bestrahlten Zellen. Die Isolierung der Mitochondrien für die Anisotropiemessungen wurde am Tag 1 nach der Bestrahlung durchgeführt. Alle analysierten Zellgruppen wurden parallel und zeitgleich bearbeitet. Das Experiment wurde zwei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

Die beiden Anisotropie-Analysen von Fluoreszenzsonde DPH an intakten Mitochondrien aus unterschiedlich behandelten OLN-93 Zellen sind in der Abbildung 45 und Abbildung 46 dargestellt.

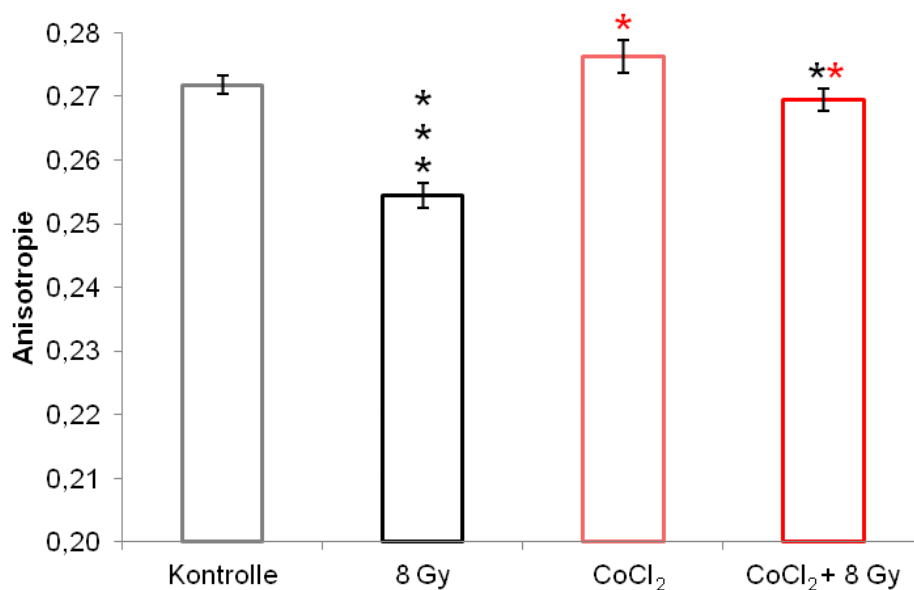


Abbildung 45: Experiment 1: Fluoreszenz-Anisotropie der DPH Sonde in mitochondrialen Membranen an intakten Mitochondrien aus unbestrahlten und bestrahlten OLN-93 Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit 300 μ M CoCl₂. Die Isolation der Mitochondrien erfolgte am Tag 1 nach der Bestrahlung. Bei der Kontrolle handelt es sich um Proben die keiner Behandlung ausgesetzt waren, dennoch gleichzeitig und gleichartig wie die unterschiedlich behandelten Proben bearbeitet wurden. Die unterschiedlich behandelten Proben sind abhängig der Behandlung im Diagramm beschriftet (8 Gy: bestrahlt; CoCl₂: CoCl₂ vorbehandelt; CoCl₂+8 Gy: CoCl₂ vorbehandelt und bestrahlt). Dargestellt sind Mittelwerte (n=10) mit Standardabweichungen. Die Behandlung von Zellen mit CoCl₂ erhöht die Fluoreszenz-Anisotropie in mitochondrialen Membranen signifikant. Die bereits in Abbildung 42 gezeigte Abnahme der Anisotropie nach der Bestrahlung mit 8 Gy wird nach der Behandlung von Zellen mit CoCl₂ reduziert. Nach t-Test sind alle Unterschiede statistisch signifikant. Mit schwarzen Sternen ist die Signifikanz zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben gekennzeichnet. Rote Sterne geben die Signifikanz zwischen CoCl₂ unbehandelten und behandelten Proben (***) p-Wert < 0,001; * p-Wert < 0,05; t-Test).

Bei der ersten Messung (Experiment 1) des Effekts von CoCl₂ auf die Fluoreszenz-Anisotropie (siehe Abbildung 45) könnte der bereits in Abbildung 42 gezeigte Effekt der Röntgenstrahlung mit 8 Gy am Tag 1 reproduziert werden. Es zeigt sich erneut, dass die Strahlung eine statistisch höchst signifikante Abnahme der Anisotropie in mitochondrialen Membranen zu Folge hat. Weiterhin zeigt die Abbildung 45, dass dieser Effekt in den Zellen die mit CoCl₂ vorbehandelt waren, vorhanden aber vermindert ist. Im Vergleich zu Kontrolle (unbehandelt mit CoCl₂ und unbestrahlt) kann hier weiterhin eine signifikante Reduzierung der Anisotropie beobachtet werden, dennoch ist diese deutlich geringer, als bei den bestrahlten Proben welche nicht mit CoCl₂ vorbehandelt wurden. Betrachtet man allerdings die CoCl₂ behandelte, nicht bestrahlte Probe im Vergleich zu Kontrollprobe zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Fluoreszenz-Anisotropie. Dieser Anstieg ist relativ gering, aber dennoch kann gefolgert werden, dass der CoCl₂ die Fluoreszenz-Anisotropie der mitochondrialen Membranen beeinflusst.

Ähnliche Änderung der Anisotropie in Abhängigkeit von der Bestrahlung und / oder CoCl_2 Vorbehandlung wurde auch bei der Wiederholung des Experiments beobachtet (siehe Abbildung 46).

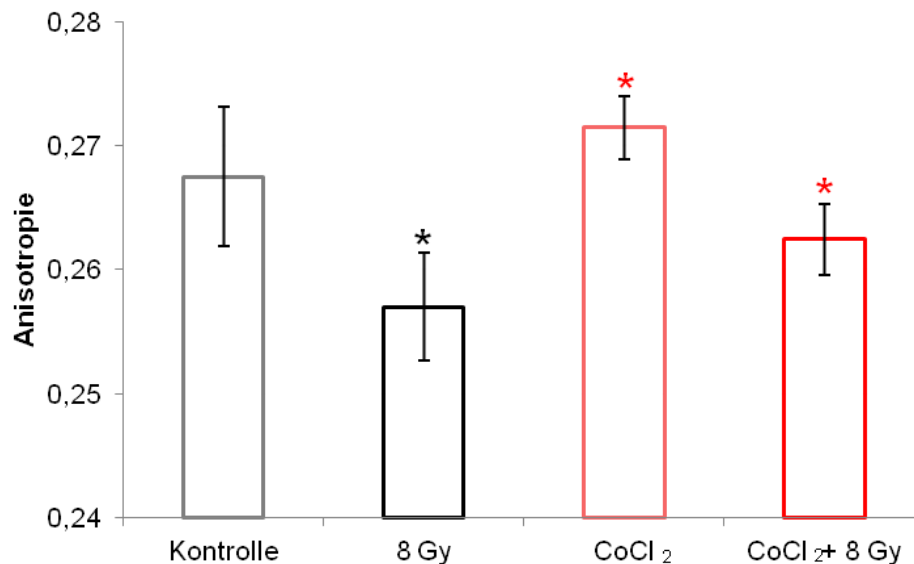


Abbildung 46: Experiment 2: Effekt von CoCl_2 auf die strahlungs-induzierte Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie von DHP in mitochondrialen Membranen an intakten Mitochondrien aus OLN-93 Zellen. Die Isolation von Mitochondrien erfolgte am Tag 1 nach der Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Weitere Erläuterungen zu Diagramm sind der Abbildung 45 zu entnehmen. CoCl_2 erhöht die Fluoreszenz-Anisotropie in mitochondrialen Proben. Der Röntgenstrahlung mit 8 Gy verursacht die Abnahme der Anisotropie. In mit CoCl_2 vorbehandelten Zellen wird der Strahlungseffekt auf die Fluoreszenz-Anisotropie vermindert. Schwarze Sterne geben die Signifikanz zwischen unbestrahlten und bestrahlten Probe wieder. Rote Sterne stehen für die Signifikanz zwischen CoCl_2 behandelten und unbehandelten Proben (* p-Wert < 0,05; t-Test).

Die Standardabweichungen sind bei der Experiment 2 bei allen Proben größer als beim Experiment 1. Dennoch sind die Tendenzen der Veränderungen von Fluoreszenz-Anisotropie auch hier erkennbar. Auf Grund stärkerer Standardabweichungen fallen die statistischen Signifikanzen zum Teil etwas niedriger. Der Unterschied zwischen unbestrahlten Proben und doppeltbehandelter Probe ist bei diesem Experiment als statistisch nicht signifikant zu betrachten. Trotzdem können hier die bereits im Zusammenhang mit der Abbildung 45 getroffene Hauptaussagen wieder belegt werden, d. h. der Einfluss von ionisierender Strahlung wird durch CoCl_2 vermindert und CoCl_2 hat selbst einen Effekt auf die Anisotropie der mitochondrialen Membran.

Aus diesen Daten kann zusammengefasst werden, dass die Vorbehandlung von Zellen mit CoCl_2 die Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die Fluoreszenz-Anisotropie, bzw. die Fluidität der mitochondriale Membran mindert. Diese Beobachtung könnte für das Erreichen

von der Hypoxie-nachahmende Bedingungen in den Zellen durch die Applikation von CoCl_2 sprechen, da die reale Hypoxie (tatsächlicher verminderter Sauerstoffgehalt) auch entgegen den Strahlungseffekten wirkt. Eine Erklärung auf der molekularen, bzw. zellulären Ebene für die beobachteten Effekte von CoCl_2 allein, sowie im Zusammenhang mit Bestrahlung kann zurzeit noch nicht gegeben werden. Aus diesem Grund können HIF-1–, bzw. Hypoxie-unabhängige Effekte ebenso nicht ausgeschlossen werden. Somit kann CoCl_2 nicht als universeller Hypoxie-Nachahmer in Zellkulturexperimenten angewendet werden. Dieser Experimentansatz bietet sich eventuell bei den Analysen der Prozesse an, die ausschließlich oder vorwiegend über den, durch HIF-1 aktivierten Signalweg gesteuert werden. Dennoch sollte bei der gegebenen Möglichkeit immer reale Hypoxie der nachahmenden Bedingungen vorgezogen werden.

Weiterhin kann wiederholt eine verminderte Fluoreszenz-Anisotropie, als Folge der Wirkung von ionisierender Strahlung in CoCl_2 unbehandelten Zellen beobachtet werden. Somit konnte in Rahmen dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass die ionisierende Strahlung eine erhöhte Fluidität der mitochondrialen Membranen verursacht.

4.2.2 Strahlungseffekte auf die Lipidzusammensetzung von mitochondrialen Membranen

In diesem Abschnitt wird der Strahlungseffekt (Röntgenstrahlung, 8 Gy) auf die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen abhängig von der Vorbehandlung der Zellen mit 300 μM CoCl_2 vorgestellt. Die Analysen der Membranlipide benötigte in der Vergangenheit oft sehr aufwendige Aufreinigungs- und Extraktionsverfahren. In diese Arbeit wurde für die Membranlipidanalyse, die von Angelini et al. entwickelte MALDI-TOF MS Methode angewendet. Diese Methode ermöglicht Lipidanalysen an intakten Membranfragmenten (Angelini et al., 2010), wie auch an intakten Mitochondrien (Angelini et al., 2012). Die Etablierung von dieser Methode an intakten Mitochondrien in unsere Arbeitsgruppe erfolgte von der Frau Stefanie Kern unter Betreuung von Dr. Michael Muschol (Kern, 2013b; Muschol, 2014)

Die nach Abschnitt 3.3.1 isolierten Mitochondrien aus unterschiedlich behandelten OLN-93 Zellen wurden direkt nach der Umpufferung der Probe in MiliQ- H_2O mit einer Proteinendkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/L}$ (Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford, siehe 3.3.2) auf das MALDI-MS Target aufgetragen. Dabei handelt es sich um die Proben: aus unbehandelten- und der Röntgenstrahlung ausgesetzten-, mit 300 μM CoCl_2 behandelten- und aus den mit CoCl_2 behandelten und zusätzlich bestrahlten Zellen. Als Matrix diente 9-AA. Die Replikatanzahl für jede Probe ist zehn und von jedem Replikat

wurden 15 Spektren aufgenommen. Die Messungen wurden am Voyager DE-Pro Massenspektrometer von Frau Stefanie Kern und Frau Christine Kern durchgeführt. Die Proben in der Probenkammer des Massenspektrometers wurden mit einem Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) ionisiert. Die Ionendetektion erfolgte in negativem Reflektor-Modus. Die folgenden Daten zur Lipidanalytik mittels MALDI-TOF MS sind bereits in den Arbeiten von der Stefanie Kern. und Christine Kern beschrieben (Kern, 2013a; Kern, 2013b).

Die Abbildung 47 bis Abbildung 50 zeigen exemplarische Spektren der unterschiedlichen Proben. In den Spektren sind die Lipid-Peaks markiert, die in allen untersuchten Proben zu finden sind (m/z Wert umkreist in schwarz). Außerdem sind Lipid-Peaks die ausschließlich in CoCl_2 unbehandelten Proben (m/z Wert umkreist in grau), wie auch in CoCl_2 behandelten Proben (m/z Wert umkreist mit punktierter Linie) vorkommen, gekennzeichnet.

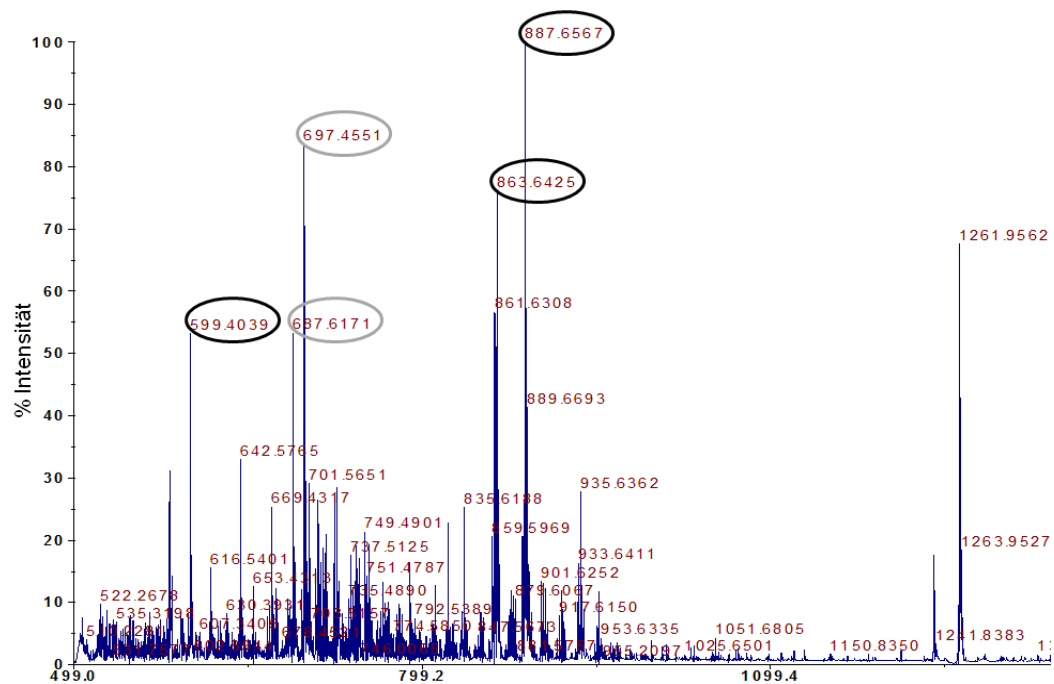


Abbildung 47: Massenspektrum der Lipide aus Mitochondrien isoliert aus unbehandelten OLN-93 Zellen (Kontrolle). Die Peaks, welcher bei allen Proben detektiert worden sind, sind mit schwarz markiert. Grau markierte Peaks sind bei allen nicht mit CoCl_2 behandelten Proben zu finden.

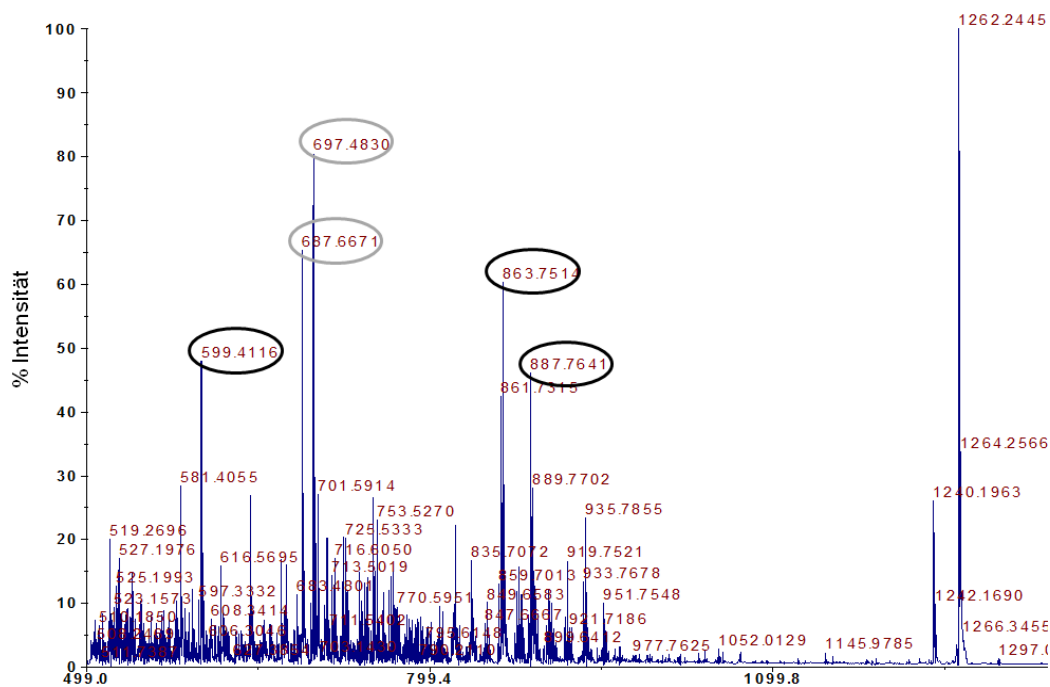


Abbildung 48: Massenspektrum der Lipide aus Mitochondrien der Röntgenstrahlung (8 Gy) ausgesetzten OLN-93 Zellen. Schwarz gekennzeichnete Peaks sind in allen analysierte Proben zu finden. Die grau markierten Peaks finden sich stets in nicht CoCl_2 behandelten Proben.

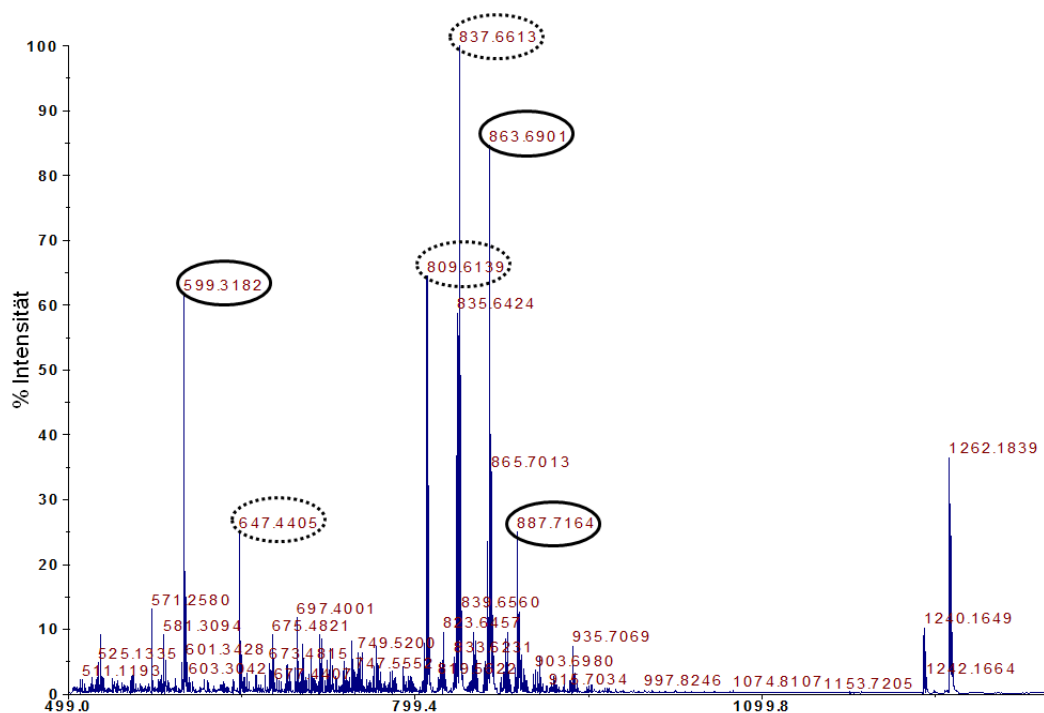


Abbildung 49: Massenspektrum der Lipide von Mitochondrien isoliert aus mit CoCl_2 behandelten Zellen. Die markierten Peaks verdeutlichen m/z Werte der Lipide die in allen analysierten Proben zu finden sind (schwarze Zirkel) sowie die Lipide die ausschließlich in CoCl_2 behandelten Zellen (punktierte Zirkel) detektiert wurden.

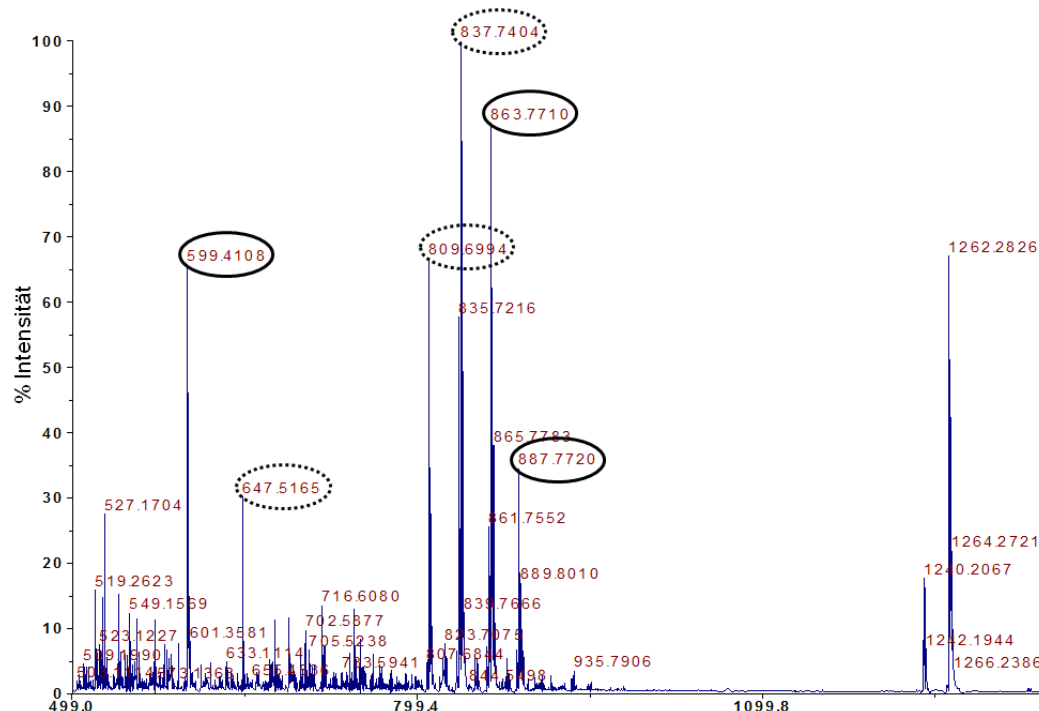


Abbildung 50: Massenspektrum der Membranlipide von Mitochondrien isoliert aus OLN-93 Zellen, welche nach der Vorbehandlung mit CoCl_2 mit Röntgenstrahlung bestrahlt wurden. Die markierten Peaks kommen in allen Proben (schwarze Zirkel) vor, bzw. wurden nur in CoCl_2 behandelten Zellen, unabhängig von der Einwirkung der Strahlung (punktierte Zirkel) detektiert.

Wie in Spektren ersichtlich, kommt bei den Proben die mit CoCl_2 behandelt wurden, verglichen zu Kontrollprobe, unabhängig davon ob die Zellen anschließend bestrahlt wurden oder nicht, zur einer spezifischen Änderung in der Lipidzusammensetzung von mitochondrialen Membranen (siehe Abbildung 49 und Abbildung 50 im Vergleich zu Abbildung 47). Diese Unterschiede sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Dagegen kann zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben kein Unterschied gesehen werden (siehe Abbildung 48 im Vergleich zu Abbildung 47). In der Tabelle 2 sind weiterhin, die in der Literatur ermittelte Identität des jeweiligen Lipids und experimentell ermittelte m/z-Werte gegenüber Referenz-m/z-Werten aufgeführt (Angelini et al., 2012). Gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und Referenz-m/z-Werten zeigen, dass die qualitative Lipidanalyse von Angelini et al. von uns erfolgreich angewendet wurde.

Schaut man sich die in der Tabelle 2 aufgeführten Lipide bezüglich deren Sättigungsgrads an, so kann bemerkt werden, dass die CoCl_2 behandelten Proben reicher an den gesättigten und ärmer an ungesättigten Fettsäuren, verglichen zu Kontrollprobe, sind. Diese kann sowohl bei den Proben, die nur mit CoCl_2 behandelt wurden, als auch bei den Proben, die zusätzlich noch der Röntgenstrahlung ausgesetzt wurden, beobachtet werden. Da die Proben, die nur

bestrahlt wurde ebenso wie Kontrollproben dieses nicht aufweisen, kann gesagt werden, dass dieser Effekt durch Behandlung von Zellen mit CoCl_2 hervorgerufen wurde.

Tabelle 2. Liste der mittels massenspektrometrischen Analyse identifiziert Lipide in mitochondrialen Membranen. Hierfür wurden die OLN-93 Zellen mit Röntgenstrahlung oder/und mit CoCl_2 behandelt. Als Kontrolle dienen unbehandelten Zellen. Aus diesen Proben isolierten Mitochondrien wurden massenspektrometrisch analysiert. In der Tabelle sind experimentell ermittelte- und Referenz-m/z-Werte sowie, aus der Literatur (Angelini et al., 2012) entnommene Lipid-Identitäten (PI = Phosphatidylinositol, PA = Phosphatidsäure) aufgeführt. In den Klammern angegebene Zahlen geben die Zahl der C-Atome bzw. die Zahl der Doppelbindungen (hinter dem Doppelpunkt) an. Mit „x“ gekennzeichnet sind die Proben, bei denen das entsprechende Lipid detektiert wurde.

[m/z] exp.	[m/z] lit.	Lipid	Kontrolle	(8 Gy)	300 μM CoCl_2	(8 Gy) / 300 μM CoCl_2
599.4	599.3	PI (18:0)	x	x	x	x
647.5	647.5	PA (32:0)	-	-	x	x
687.6	687.5	PA(35:1)	x	x	-	-
697.4	697.5	PA (36:3)	x	x	-	-
809.5	809.5	PI (32:0)	-	-	x	x
837.5	837.5	PI (34:0)	-	-	x	x
863.5	863.6	PI (36:1)	x	x	x	x
887.6	887.6	PI (38:8)	x	x	x	x

Zusammenfassend kann aus der hier vorgestellten massenspektrometrischen Lipidanalyse an intakten Mitochondrien aus Kontroll- und Röntgenstrahlung ausgesetzte OLN-93 Zellen gesehen werden, dass die ionisierende Strahlung keinen Effekt auf die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen hat. Anders zeigte die Behandlung der Zellen mit CoCl_2 , unabhängig ob die Zellen zusätzlich der Strahlung ausgesetzt wurden, einen Effekt. Auffällig bei den hier detektierten Lipiden ist dabei, dass diese Proben einen höheren Sättigungsgrad der Fettsäuren aufweisen, als Kontroll- oder bestrahlte Probe.

Angesichts dieser Beobachtung und der im Abschnitt 4.2.1 vorgestellten Analysen der Membranfluidität, in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl_2 kann ein Zusammenhang festgestellt werden. Da Membranfluidität mit höherem Sättigungsgrad der aufbauenden Lipide abnimmt (Brown, 2002), erklärt dieses Ergebnis möglicherweise die

oben beschrieben reduzierenden Effekte von CoCl_2 auf die Membranfluidität, sowie den verminderten Effekt der ionisierenden Strahlung in CoCl_2 -behandelten Zellen (siehe Abschnitt 4.2.1, Abbildung 45 und Abbildung 46).

Weiterhin bestätigen die hier vorgestellten Ergebnissen, die bereits bei der Fluoreszenz-Anisotropie Analysen gemachte Aussage, dass CoCl_2 sich als Hypoxie-Imitator nicht für die Analysen der Membraneigenschaften eignet, da durch die Behandlung von Zellen mit CoCl_2 allein hervorgerufene Änderungen, nicht eindeutig der Hypoxie-nachahmenden Bedingungen zugeschrieben werden können.

4.3 Zelluläre und mitochondriale Aktivität unter dem Einfluss von ionisierender Strahlung

Physiologische Prozesse einer Zelle, wie z.B.: Zellteilung, Proliferation, DNA-Reparatur, Stoffwechsel, Transportvorgänge, Signaltransduktion und Apoptose sind komplex organisiert und resultieren aus vielen mitochondrialen und zellulären Aktivitäten. Neben Mitochondrien bilden verschiedene Organellen einer Zelle funktionsfähige Komponenten, deren Aktivitäten ebenfalls für zelluläre Prozesse von Wichtigkeit sind. Die Prozesse, die in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt ablaufen, hängen von Energie, Substraten, Proteinen und Enzymen, die in der Zelle zur Verfügung stehen, ab. Außerdem sind einzelne zelluläre Prozesse untereinander gekoppelt und unterliegen komplexen Regulationsmechanismen. Bei der Einwirkung von Stressfaktoren auf die Zelle findet eine rasche Umregulierung von physiologischen Prozessen statt.

Im Folgenden werden Einblicke in die Veränderungen von einigen physiologischen Prozessen, bzw. in den physiologischen Zustand von OLN-93 Zellen nach der Einwirkung von Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 8 Gy vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die intrazellulären Mengen von ROS und ATP analysiert. Weiterhin wurden die Messungen des mitochondrialen Membranpotentials, sowie von metabolischen und endozytosolischen Aktivitäten durchgeführt. Bei diesen Analysen wurden die Veränderungen in ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung in den Zellen beobachtet. Außerdem wurde das Wachstum der bestrahlten Zellpopulation bis zum Tag 10 nach der Bestrahlung untersucht.

4.3.1 Analyse von ROS Menge in den OLN-93 Zellen

Die intrazelluläre ROS Produktion stellt bei physiologischen Bedingungen einen wichtigen, unvermeidlichen Prozess dar (Skulachev, 1996). Pathologisch gesehen ist die mitochondriale ROS Produktion besonders wichtig (Kaludercic et al., 2014), da dadurch in der mitochondrialen DNA, in welcher die Introns und Schutzproteinen fehlen, verstärkt Mutationen auftreten können. Auch das, für die Proteinfunktion wichtige und in der inneren mitochondrialen Membran befindliche, Cardiolipin ist durch seine zahlreiche Doppelbindungen für die oxidativen Schäden besonders anfällig (Paradies et al., 2011; Skulachev, 2013). Außerdem kann ROS die Membranpermeabilität erhöhen, wodurch die Cytochrom c Freisetzung und somit der intrinsische Apoptoseweg induziert werden kann (Park et al., 2005). Weiterhin kann ROS bei der Aktivierung von extrinsischem Apoptoseweg involviert sein (Fernandez and Perl, 2009). Diese und weitere pathologische Prozesse sind die Folge des oxidativen Stresses. Allerdings ist der oxidative Stress nicht allein durch die Produktion von ROS bedingt, sondern stellt ein Ungleichgewicht zwischen ROS Produktion

und der antioxidativen Abwehr der Zelle dar (Andreyev et al., 2005). Durch eine Erhöhung der ROS Konzentration in der Zelle, z. B. durch Einwirkung der ionisierenden Strahlung (Park et al., 2005), erfährt die Zelle den Zustand des oxidativen Stresses.

In Folgendem ist die Analyse des relativen ROS Gehalts in den Zellen dargestellt. Dabei wurde der Strahlungseffekt, abhängig von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl_2 (siehe Abschnitt 3.2.4) untersucht. Die ROS Messungen erfolgten mit Hilfe von DCFH-DA. DCFH-DA ist ein nicht fluoreszierender ROS-Sensor, welcher in die Zelle diffundiert. Intrazellulär wird DCFH-DA durch endogene Esterasen zu 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) deacetyliert und hat durch die entstandene Polarität eine geringere Membranpermeabilität. Das so entstandene DCFH wird im Zytosol durch ROS über das intermediäre Zwischenprodukt, 2',7'-Dichlorofluorescein-Radikal ($\text{DCF}^{\bullet-}$) zu fluoreszierendem 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Die Oxidation von DCFH erfolgt durch ein breites Spektrum von ROS Molekülen. Aus diesem Grund wird der Nachweis von intrazellulären ROS mittels der DCFH-DA-Methode als Indikator eines allgemeinen zellulären oxidativen Stresses herangezogen (Dikalov et al., 2007; Halliwell, 2007).

Die Inkubation von je $2,3 \times 10^4$ Zellen mit DCFH-DA erfolgte 40 Minuten lang bei 37°C . Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der fluoreszierende DCF in den Proben am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd. (ex./em., $\lambda=488 \text{ nm} / \lambda=530 \text{ nm}$) vermessen. Analysiert wurde der Effekt der Röntgenstrahlung auf die ROS Menge in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl_2 an Tag 1, 3, 8, 10 und 14 nach Bestrahlung. In Abbildung 51 sind die Ergebnisse der ROS Analyse graphisch dargestellt.

Die Anzahl der Replikate, die für jede Probe vermessen wurden, ist sieben. Die ermittelten Standardabweichungen sind bei allen Proben hoch und nach dem t-Test ergeben sich hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dennoch kann aus der Grafik gesehen werden, dass an Tag 1, 10, und 14 nach der Bestrahlung eine tendenzielle Erhöhung der ROS Menge nach der Bestrahlung beobachtet werden kann (ca. 35 % - 69 %-iger Anstieg im Vergleich zur Kontrolle). Zu allen analysierten Zeiten zeigt der CoCl_2 allein keine Effekte auf die ROS Menge in den Zellen (ausgenommen Tag 3). Allerdings kann der, am Tag 1 beobachtete Strahlungseffekt in den Zellen, welche mit CoCl_2 vorbehandelt waren, nicht beobachtet werden. Demzufolge wirkt CoCl_2 bezüglich der ROS Akkumulation der Strahlung entgegen. Diese Effekte können sowohl am Tag 1, als auch am Tag 14 beobachtet werden. An Tag 3 und 8 sind die Werte für alle analysierten Proben ähnlich und es können keine Unterschiede in der ROS Menge, in den unterschiedlich behandelten Zellen, erkannt werden. Die Messungen am Tag 3 ergeben die stärksten Standardabweichungen und aus diesem

Grund können diese nicht eindeutig interpretiert werden. Am Tag 10 nach der Bestrahlung zeigt die CoCl₂ vorbehandelte und bestrahlte Probe (roter Balken) ähnliche ROS Menge wie die bestrahlte Probe (schwarzer Balken), was im Widerspruch zur Messungen an restlichen Tagen der Analyse steht. Diese Daten können auf Grund dieses Widerspruchs ebenfalls nicht mit den übrigen Daten diskutiert werden.

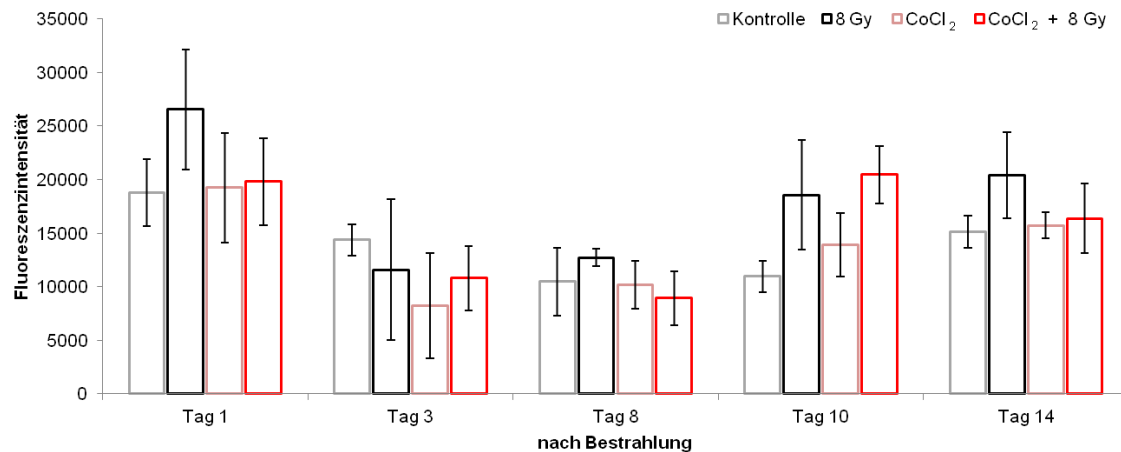


Abbildung 51: Analyse der ROS Mengen in den OLN-93 Zellen an Tag 1, 3, 8, 10 und 14 nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (8 Gy) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl₂. Je $2,3 \times 10^4$ unterschiedlich behandelte OLN-93 Zellen wurden in schwarze 96-Lochplatte ausgesät und für 40 Minuten in DCFH-DA haltigem Medium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Fluoreszenz von DCF gemessen (ex./em., $\lambda=488$ nm/ $\lambda=530$ nm). Dargestellt sind Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten und Standardabweichungen (n=7). Die Unterschiede zwischen einzelnen Proben sind statistisch nicht signifikant. Die Analyse von allen Proben an ein und demselben Tag wurde gleichzeitig durchgeführt. An Tag 1, 10 und 14 kann eine tendenzielle Erhöhung von ROS in bestrahlten Zellen, verglichen zur Kontrolle, detektiert werden. Die Experimente wurden zusammen mit Frau Christine Kern im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt.

Zusammengefasst wurde, wie erwartet (Park et al., 2005), nach der Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy) eine erhöhte ROS Akkumulation an Tag 1, 10 und 14 nach der Bestrahlung beobachtet werden. Der spät-strahlungsinduzierte ROS-Anstieg in Zellen ist beschrieben als eine Folge der Akkumulation von Mutationen in mitochondriale DNA, die zur mitochondriale Dysfunktion führen (Prithivirajsingh et al., 2004). Die publizierten Studien über die ROS Analysen unter hypoxischen- bzw. unter hypoxie-nachahmenden Bedingungen sind zum Teil kontrovers (Klimova et al., 2009; Packer and Fuehr, 1977; Saito et al., 1995). Die meisten Forscher postulieren jedoch einen Anstieg der intrazellulären ROS und die Beteiligung von ROS bei der Aktivierung von HIF-1 Signalwegs (Ardyanto et al., 2006; Chachami et al., 2004; Chandel et al., 2000; Lee et al., 2013). Die hier vorgestellte Analyse der intrazellulären ROS-Menge in mit 300 μ M CoCl₂ behandelten OLN-

93 Zellen zeigt, verglichen zur Kontrolle, keine Veränderungen. Im Zusammenhang mit Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung (8 Gy) wirkt CoCl_2 entgegengesetzt dem Strahlungseffekt (ausgenommen Tag 3 und 10). Die in der Literatur beschriebenen Effekte der Hypoxie auf die Strahlungsantwort der Zelle sind jedoch nicht durch die Reduzierung der ROS Akkumulation, sondern durch das Erlangen der Fähigkeit zur erhöhten Toleranz gegenüber ROS gegeben (Cairns et al., 2011; Curry et al., 2014). Aus diesem Grund muss an der Stelle gesagt werden, dass durch die Behandlung von OLN-93 Zellen mit 300 μM CoCl_2 keine Hypoxie-nachahmende Bedingungen hergestellt wurden.

4.3.2 Mitochondriales Membranpotential

Einige Gliazellen, zu denen auch OLN-93 Zellen zählen, zeichnen sich aus durch beträchtliche Beständigkeit gegenüber oxidativen Stress, verglichen zu Neuronen. Dieses Merkmal ermöglicht den Gliazellen das Überleben, mitochondriale Funktionalität, sowie Schutzfunktion gegenüber den Neuronen bei oxidativen Stress (Bajic et al., 2013). Das mitochondriale Membranpotential stellt einen Kontrollpunkt, sowohl bei der Regulierung des Zelltods, als auch bei der ATP- Produktion dar (Fernandez and Perl, 2009). Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ermöglicht somit Aussagen über den Zustand der Mitochondrien bzw. Zellen.

Der kationische, lipophile Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) kann in unterschiedlich fluoreszierenden Formen vorliegen. Von gesunden Mitochondrien mit stabil hohem Membranpotential wird der Farbstoff aufgenommen und liegt in der Mitochondrienmatrix als J-Aggregat vor. Nach Anregung mit Licht von 488 nm Wellenlänge emittieren die Aggregate rotes Licht ($\lambda=585$ nm). In dem Zytoplasma liegt der Farbstoff als JC-1 Monomer vor. Die Emission der JC-1 Monomere wird als grüne Fluoreszenz ($\lambda=530$ nm) detektiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale (rot/grün) beschreibt das mitochondriale Membranpotential (Salvioli et al., 1997).

Analysiert wurden die Effekte der ionisierenden Strahlung, in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen mit CoCl_2 , dem in der Literatur beschriebenen Hypoxie-Nachahmer. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 52 dargestellt. Pro jede Probe wurden 7 Replikate vermessen. In dem Diagramm sind Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

Das mitochondriale Membranpotential erhöht sich statistisch signifikant am Tag 1 in den Röntgenstrahlung ausgesetzten Zellen verglichen zur Kontrolle. Zu späteren Zeitpunkten

nach der Bestrahlung ergeben sich keine Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben. Die Vorbehandlung von Zellen mit CoCl_2 zeigt eine entgegengesetzte Wirkung auf die Strahlungsantwort bezüglich mitochondrialem Membranpotential. Die Zellen, die nur CoCl_2 Behandlung unterzogen waren, zeigen, verglichen zu Kontrolle, keine Unterschiede in dem mitochondrialen Membranpotential (ausgenommen Tag 3). Am Tag 3 nach der Bestrahlung kann für die CoCl_2 vorbehandelte und bestrahlte Probe (roter Balken) eine statistisch nicht signifikante Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden. Über die Zeit weichen die rot zu grün Fluoreszenzintensitäten Verhältnisse stark ab. Die Fluoreszenzmessungen, welche nicht zu gleichem Zeitpunkt (unterschiedliche Tage nach der Bestrahlung) durchgeführt wurden, könnten zu den Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten geführt haben.

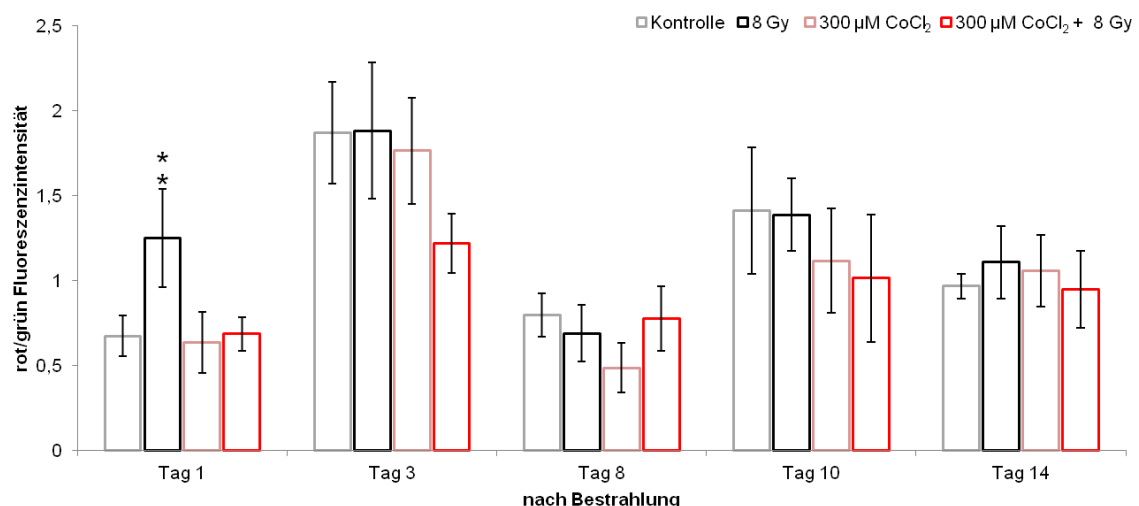


Abbildung 52: Analyse von mitochondrialem Membranpotential in unbehandelten, bestrahlten, CoCl_2 behandelten und sowohl bestrahlten als auch mit CoCl_2 behandelten OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung mit 8 Gy (Röntgenstrahlung) mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff JC-1. JC-1 akkumuliert Membranpotential-abhängig in den Mitochondrien als J-Aggregat. Zytoplasmisch lokalisiertes JC-1 liegt als Monomer vor. Die Emissionsspektren der beiden JC-1 Formen liegen im roten (mitochondrial, $\lambda=585$ nm) und im grünen (zytoplasmisch, $\lambda=530$ nm) Bereich. Somit zeigt das Verhältnis von roten zu grünen Fluoreszenzintensitäten das mitochondriale Membranpotential an. Die Messungen erfolgten am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd. Die Experimente wurden zusammen mit Frau Christine Kern im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n=7$). Am Tag 1 nach der Bestrahlung zeigt sich eine statistisch signifikante Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in bestrahlten Proben, verglichen zur Kontrolle (** \approx p-Wert < 0,01; t-Test).

Das Ergebnis der Untersuchung von mitochondrialen Membranpotential in Abhängigkeit von Bestrahlung von Zellen ist, dass ca. 24 Stunden nach der Bestrahlung eine Hyperpolarisation auftritt. Die Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials wird oft als früher Indikator für extrinsische Apoptose, oder Nekrose von Zellen beschrieben (Banki et al., 1999;

Fernandez and Perl, 2009; Nagy et al., 2007). Die Apoptose ist wie auch Proliferation ein ATP-abhängiger Prozess. Die ATP Absenz und das erhöhte mitochondriale Membranpotential deuten nekrotischen Zelltod an. Im Zusammenhang mit erhöhter ATP und ROS Menge wurde Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran als Indiz für Apoptose beschrieben (Fernandez and Perl, 2009). In Rahmen dieser Arbeit konnten keine erfolgreichen Messungen zu Apoptoserate durchgeführt werden, weshalb dieser Aspekt nur als eine mögliche Erklärung gesehen werden kann. Eine weitere Erklärung für die Erhöhung von mitochondrialen Membranpotential könnte ein erhöhte ATP Bedarf in Folge der Reparaturprozesse in den, durch Strahlung, geschädigten Zellen sein. Bekanntlich sind sowohl DNA-Reparaturprozesse (Palomera-Sanchez and Zurita, 2011), als auch Funktionen der meisten Chaperone ATP-abhängig (Kim and Kim, 2011). Die CoCl_2 Behandlung allein verursacht keine statistisch signifikante Änderungen in dem mitochondrialen Membranpotential. Am Tag 3 kann in CoCl_2 vorbehandelten und bestrahlten Proben eine tendenzielle Depolarisation der mitochondrialen Membran beobachtet werden. Wie bei der ROS Analyse kann auch hier, im Zusammenhang mit Bestrahlung eine Wirkung von CoCl_2 beobachtet werden. So ist am Tag 1 beobachtete Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials nach der Bestrahlung (schwarzer Balken) nicht in CoCl_2 vorbehandelten und bestrahlten Proben (roter Balken) erkennbar. Bezüglich der erläuterten Korrelation zwischen Apoptose und Hyperpolarisation könnte dieses einen Apoptose-hemmenden Effekt des CoCl_2 andeuten. Apoptose Hemmung nach der Bestrahlung kann auch bei der realen Hypoxie beobachtet werden (Adams et al., 1997; Lee et al., 2004). Dieser Aspekt spricht für das Herrschen der Hypoxie-nachahmenden Bedingungen in den Zellen welche mit $300\ \mu\text{M}$ CoCl_2 -haltigem Medium kultiviert wurden. Diese Annahme steht allerdings im Widerspruch mit ROS Analyse (siehe Abschnitt 4.3.1), wo der erwartete Anstieg von ROS in CoCl_2 behandelten Zellen nicht erfolgte. Aus diesem Grund sind Hypoxie- bzw. HIF-1- unabhängige Prozesse, die anderweitig (HIF-1 unabhängig) durch CoCl_2 hervorgerufen sein könnten, mit größere Wahrscheinlichkeit für die beobachtete Wirkung von CoCl_2 auf die Strahlungsantwort der Zellen zuständig.

4.3.3 Energiestatus von Zellen

Eine universelle Energiewährung aller Zellen welche sowohl für das Überleben, als auch für den Zelltod benötigt wird ist ATP. Wie bereits erwähnt sind Zellproliferation, Wachstum, DNA-Replikation, Zellteilung, Membrantransportprozesse, Proteinfaltung wie auch Apoptose ATP-abhängige Prozesse. Auch diversen Reparaturprozessen, die sowohl nach spontan entstandenen, als auch nach stressinduzierten Schäden von Biomolekülen stattfinden,

benötigen ATP. Die intrazelluläre ATP Konzentration ist in jedem Moment von der Produktion und von dem Verbrauch abhängig.

In Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre ATP Menge in Abhängigkeit von der Einwirkung von Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 8 Gy auf die OLN-93 Zellen in einer Zeitspanne von 14 Tagen untersucht. Die ATP Messungen wurden fluorometrisch mit Hilfe von *ATP Assay Kit* von Firma *abcam®* durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung von ATP Konzentrationen in Zellen (siehe 3.5.1). Insgesamt drei unabhängige Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurden zwei Experimente in Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit mit Frau Christine Kern durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind bereits in ihre Masterarbeit aufgeführt (Kern, 2013a). Die einzelnen Durchführungen liegen über mehrere Monate voneinander getrennt. Stets wurden Zellen aus gleichen Passagen und nach gleichem Durchführungsprotokoll untersucht.

Die Auswertung der ersten Experimentdurchführung ist in der Abbildung 53 wiedergegeben. Die ermittelte ATP Menge bei der ersten Experimentdurchführung liegt bei unbestrahlten Proben zwischen 0,8 und 3,9 fmol pro Zelle. Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Bestrahlung kann, verglichen zur Kontrolle (unbestrahlte Zellen), eine statistisch signifikanten Zunahme der ATP Menge in bestrahlten Proben beobachtet werden. Die absolute ATP Menge befindet sich in bestrahlten Proben im Bereich zwischen 2,6 und 6,1 fmol pro Zelle. Am Tag 1 nach der Bestrahlung ergibt sich somit eine über 400 %-ige Zunahme in der ATP Menge. Verglichen zur Kontrolle stellen sich bei späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung für die ATP-Konzentration Erhöhungen von ca. 160 % bis ca. 260 % heraus (siehe Abbildung 53 B). Die ATP Menge variiert in unbestrahlten wie auch in bestrahlten Zellen über die Zeit (siehe Abbildung 53 A). Die ATP Konzentrationsänderungen über die Zeit zeigen in beiden Probengruppen (unbestrahlt und bestrahlt) den gleichen Verlauf. Die größte ATP Konzentration kann sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten Zellen am Tag 7 gemessen werden. An Tag 1, 4, 11 und 14 wurden niedrigere ATP Konzentrationen detektiert.

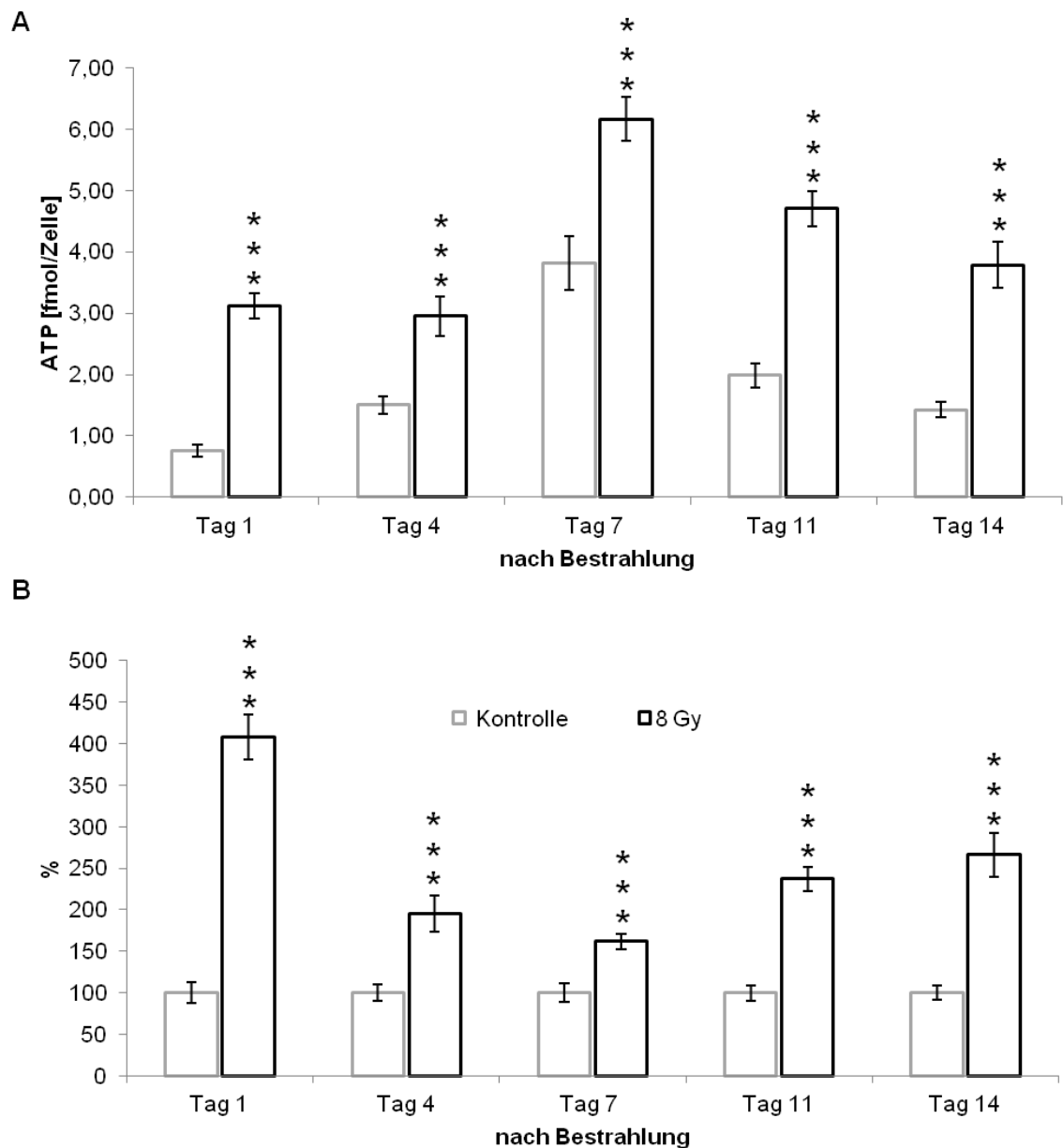


Abbildung 53: Analyse der intrazellulären ATP Menge in den ersten 14 Tagen nach Bestrahlung in OLN-93 Zellen (Experimentdurchführung 1). A: durchschnittliche absolute ATP Menge in einer Zelle in fmol. Absolute ATP Menge wird anhand eine Kalibrierungsgerade ermittelt. B: prozentuelles Verhältnis der ATP Menge in bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen bezogen sich auf die Menge in unbestrahlten Proben (Kontrolle). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die ATP Menge in Zelllysaten mittels ATP Assay Kit von *abcam*® am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=6). Die ATP Menge in unbestrahlten Zellen beträgt zwischen 0,8 und 3,9 fmol und in bestrahlten zwischen 2,6 und 6,1 fmol. In bestrahlten OLN-93 Zellen kann zu allen untersuchten Zeitpunkten statistisch höchst signifikante Erhöhung der ATP Menge nachgewiesen werden (***) p-Wert < 0,001; t-Test).

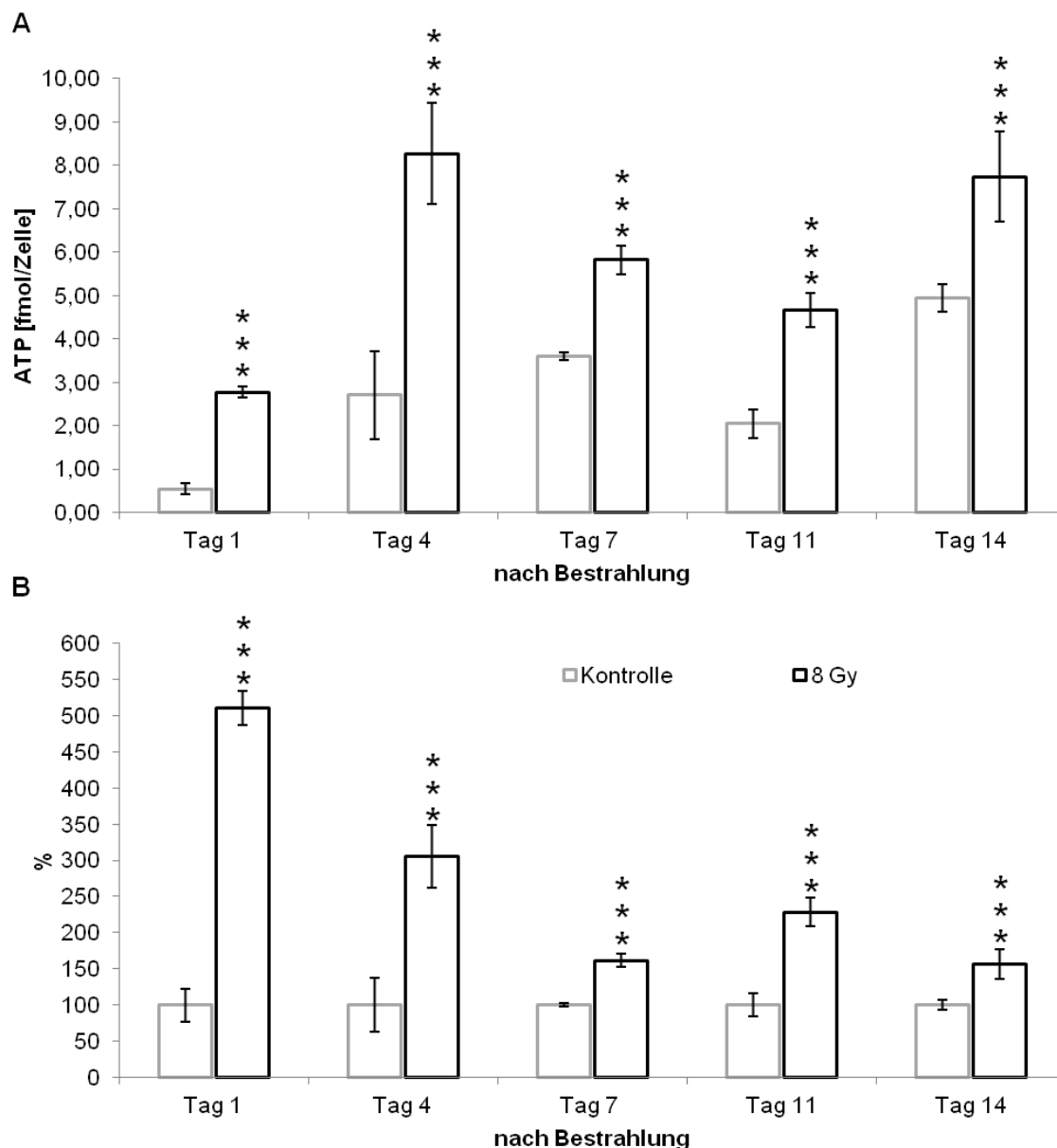


Abbildung 54: ATP Menge in ersten 14 Tagen nach Bestrahlung in OLN-93 Zellen (Experimentdurchführung 2). A: ATP Menge in fmol pro Zelle ermittelt anhand einer Kalibrierungsgerade. B: prozentuelles Verhältnis der ATP Menge in bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen bezogen auf die Menge in unbestrahlten Proben (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=6). Die ATP Menge in unbestrahlten Zellen beträgt zwischen 0,6 und 5 fmol und in bestrahlten zwischen 2,8 und 8,3 fmol. In bestrahlten OLN-93 Zellen kann zu allen untersuchten Zeitpunkten statistisch höchst signifikante Erhöhung der ATP Menge nachgewiesen werden (***) \approx p-Wert < 0,001; t-Test).

Die Abbildung 54 stellt die Auswertung der ATP Menge aus zweitem Experimentdurchlauf dar. Auch hier kann die höchst statistisch signifikante Erhöhung der ATP Menge in den Zellen nach der Bestrahlung zu allen analysierten Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die absolute ATP Menge in bestrahlten Zellen liegt bei 2,8 bis 8,3 fmol pro Zelle, während in unbestrahlten Zellen ATP Menge 0,6 bis 5 fmol pro Zelle beträgt. Der stärkste Anstieg der

ATP Menge, über 500 %, resultiert am Tag 1 nach der Bestrahlung. Die Erhöhungen an Tag 4 bis 14 belaufen sich im Bereich zwischen ca.160 % und ca. 300 % der ATP Menge von entsprechende Kontrollen.

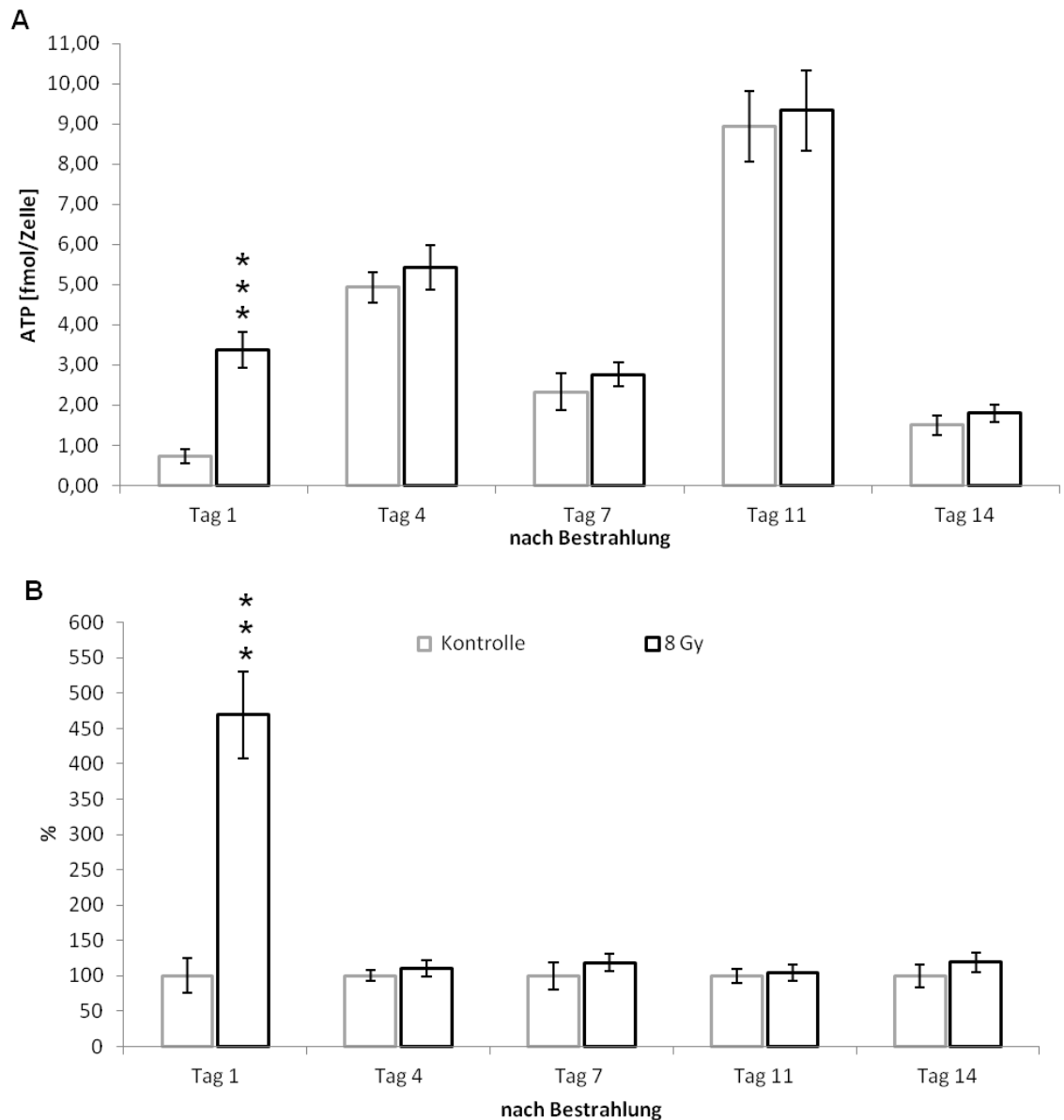


Abbildung 55: Intrazelluläre ATP Menge in OLN-93 Zellen in ersten 14 Tagen nach Bestrahlung mit 8 Gy (Experimentdurchführung 1). A: absolute ATP Menge pro einer Zelle in fmol. Absolute ATP Menge wird anhand eine Kalibrierungsgerade ermittelt. B: prozentuelles Verhältnis der ATP Menge in bestrahlten (8 Gy) OLN-93 Zellen bezogen auf die Menge in unbestrahlten Proben (Kontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=6). Die ATP Menge in unbestrahlten Zellen beträgt zwischen 0,7 und 9 fmol und in bestrahlten zwischen 1,8 und 9,3 fmol. Eine statistisch höchst signifikante Erhöhung der ATP Menge kann am Tag 1 nach der Bestrahlung beobachtet werden (***) \approx p-Wert < 0,001; t-Test).

Die Auswertung des dritten Experimentdurchlaufs ist in der Abbildung 55 grafisch dargestellt. Anders als bei den beiden bereits vorgestellten Analysen, ergibt sich hier ein statistisch signifikanter Anstieg der intrazelluläre ATP Menge von über 450 % nur am Tag 1 nach der Bestrahlung. Zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung können keine Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben gesehen werden. Durchschnittliche ATP Mengen pro Zelle liegen bei unbestrahlten Proben zwischen 0,7 und 9 fmol und bei bestrahlten zwischen 1,8 und 9,3 fmol (siehe Abbildung 55 B). Ähnlich wie in erstem und zweitem Experimentdurchlauf kann auch hier gezeigt werden, dass die ATP Menge sowohl in unbestrahlten, als auch in bestrahlten Proben stark über die Zeit variiert (siehe Abbildung 55 A).

Insgesamt kann resümiert werden, dass ca. 24 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy (Röntgenstrahlung) eine ca. 400 bis ca. 500 %-ige Zunahme der ATP Menge in Zellen beobachtet werden kann. Für spätere Zeitpunkte zeigen zwei von insgesamt drei Analysen ebenfalls beträchtlichen Zunahmen der intrazellulären ATP Mengen nach der Bestrahlung. Bei dem dritten Experimentdurchlauf zeigen sich verglichen zur Kontrolle an Tagen 4 bis 14 keine Veränderungen. Eine mögliche Erklärung für das Abweichen dieses Ergebnisses (Experimentdurchführung 3, siehe Abbildung 55) kann sein, dass die durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen DNA-Schäden zur Aktivierung von einem oder mehreren Onkogenen resultiert haben (Little, 2000). Im Durchschnitt verursacht eine Energiedosis von 4 Gy in der nuklearen DNA einer einzelnen Zelle ca. 160 Doppelstrangbrüche, 5000 Einzelstrangbrüche, 5000 Basenschäden und 600 DNA-Protein Interaktionen (Burkart et al., 1999). Immerhin erfolgt die Bestrahlung von einer gesamten Zellpopulation und das Ausmaß der Schäden in jede einzelne Zelle kann extrem unterschiedlich sein. Folglich werden in unterschiedlichen Zellen auch unterschiedliche Prozesse wie Apoptose, Reparatur oder auch Proliferation angeleitet. Bei der Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressoren kann es zur Entartung von betroffenen Zellen, durch Erlangen von Überlebens- bzw. Proliferationsvorteilen kommen. In diesem Fall könnten die zellulären Prozesse auf unterschiedlichste Weisen reguliert werden und diese können nicht anhand, im Rahmen dieser Arbeit, durchgeführter Experimente nachvollgezogen werden. Die am Tag 1 nach der Bestrahlung beobachtete Erhöhung von ATP könnte die erhöhte Aktivität des Komplexes V der Atmungskette bedeuten. Direkt nach der Bestrahlung (Tag 1) könnte die Priorität der Zelle der Erhalt von genomischer Information sein, was die Erhöhung der ATP Produktion erklären würde, um wichtige ATP-abhängige Reparaturprozesse durchführen zu können. Anders könnte dieser Anstieg auch den permanenten Zellzykularrest (Ross, 1999) und die Runterregulierung von ATP-abhängigen Prozessen signalisieren. Zusätzlich könnte ATP Anstieg das Anleiten von Apoptose anzeigen (Fernandez and Perl, 2009). Dieser

Aspekt wurde bereits im Zusammenhang mit dem gemessenen erhöhten mitochondrialen Membranpotential und gestiegenem ROS-Gehalt am Tag 1 nach der Bestrahlung in den Zellen diskutiert. Denkbar ist, dass in der bestrahlten Zellpopulation eine Vielzahl an unterschiedlichen Ereignissen in den unterschiedlichen Zellen stattfinden und der ATP Anstieg als Summe aus diesen unterschiedlichen Prozessen resultiert. Die ermittelte ATP Menge pro Zelle im Femtomol-Bereich entspricht der in der Literatur beschriebenen ATP Menge einer eukaryontischen Zelle (BioThema, ATP Biomass Kit HS). Dr. M. Frenzel, ehemalige Doktorantin in unserer Arbeitsgruppe analysierte bereits in Rahmen Langzeitstudie (Tag 15 bis 193) die Wirkung von Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 8 Gy auf die ATP Menge in NHDF Fibroblasten. Sie ermittelte für unbestrahlte Zellen eine in etwa konstante ATP Menge über diesen Zeitraum von ca. 4 fmol pro Zelle. Am Tag 15 und 28 nach der Bestrahlung konnte sie in bestrahlten Zellen eine Verdopplung der ATP Menge beobachten. Für spätere Zeitpunkte verhielt sich ATP Menge in bestrahlten Proben ähnlich wie in unbestrahlten (Frenzel, 2011). Im Vergleich dazu variiert, im Rahmen meiner Arbeit, ermittelte ATP Menge in OLN-93 Zellen deutlich stärker. Dennoch sind absolute ATP Mengen beider Zelltypen ähnlich. Weiterhin kann der an Tag 15 und 28 beobachtete Anstieg in bestrahlten Proben aufbauend auf die Studie an OLN-93 Zellen eine langfristige Wirkung von ionisierender Strahlung auf die ATP Menge bedeuten.

4.3.4 Wachstumsanalyse der Zellpopulation

Mittels Wachstumsanalyse der Zellpopulation können Erkenntnisse über Zellproliferation und Apoptose gewonnen werden. Anhand der Wachstumskurve eine Zellpopulation kann die Verdopplungszeit dieser bestimmt werden. Die Änderungen in der Verdopplungszeit der Zellpopulationen korrelieren mit Änderungen in der Apoptoserate und/oder Zellproliferation. So bedeutet eine Erhöhung der Verdopplungszeit eine verlangsamte Zellproliferation bzw. eine erhöhte Apoptoserate.

Im Folgenden werden die Wachstumsanalysen von unbestrahlten und bestrahlten OLN-93 Zellen verglichen (siehe Abbildung 56). Die Wachstumsanalyse der Zellpopulationen wurden über 9 Tage durchgeführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe von Zellzähler *Scepter*TM vom Millipore wie im Abschnitt 3.5.4 beschrieben. Die Ermittlung von Verdopplungszeit erfolgt an Hand der Steigung des exponentiellen Teils der Wachstumskurve.

Während die Zellwachstumskurve von unbestrahlten OLN-93 Zellen einen typischen Verlauf mit Anlauf-, Exponentielle-, Stationäre- und Absterbephase aufweist, ist dieser bei bestrahlten Zellen verändert. Hier sind keine einzelnen Phasen erkennbar. Die Zellzahl in bestrahlten Proben nimmt über die gesamte Zeit beinahe linear zu. Die exponentielle Phase

der Wachstumskurve bei unbestrahlten Proben ist zwischen 48 und 72 Stunden gegeben. Hieraus berechnet sich für die unbestrahlten Proben eine Verdopplungszeit von ca. 11,6 Stunden. In der gleichen Zeitspanne ermittelte Verdopplungszeit für die bestrahlten OLN-93 Zellen beträgt ca. 22,2 Stunden.

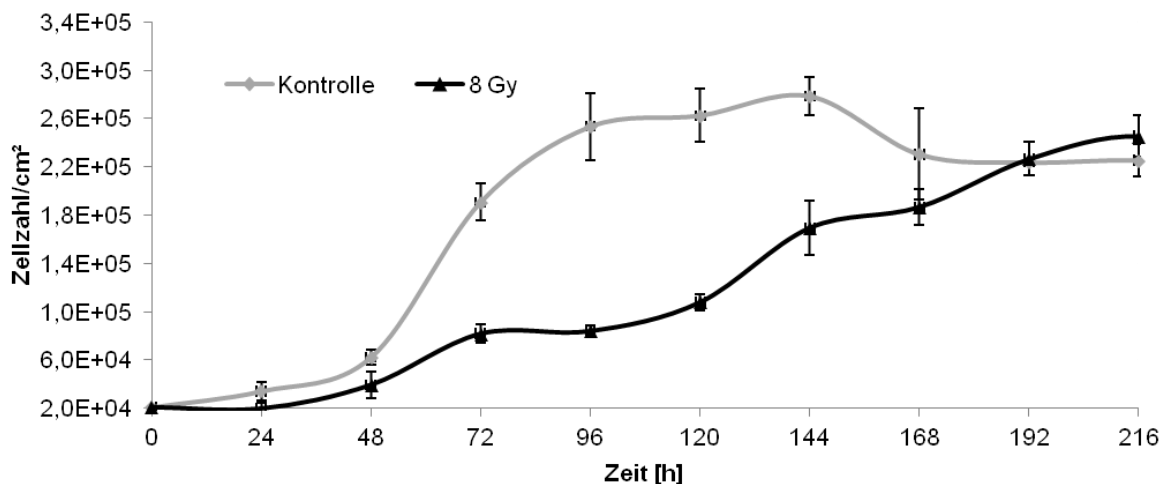


Abbildung 56: Effekt von Röntgenstrahlung (8 Gy) auf das Wachstum der OLN-93 Zellpopulationen. Je $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät und in 24-stündigen Abständen steigende Zellzahl mit Hilfe *Scepter*TM von Millipore bestimmt. Der Experiment wurde zusammen mit Frau Christine Kern im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3). Die unbestrahlten Zellen (Kontrolle) zeigen einen typischen Zellwachstumskurven-Verlauf mit Anlauf-, Exponentielle-, Stationäre- und Absterbephase. Wachstumskurven-Verlauf von bestrahlten Proben ist im Vergleich dazu stark beeinflusst.

Die verlängerte Verdopplungszeit bei den bestrahlten OLN-93 Zellen deutet auf die verlangsamte Zellproliferation bzw. auf eine erhöhte Apoptoserate nach der Bestrahlung. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass eine verstärkte apoptotische Aktivität und eine verlangsamte Proliferation vermutlich nicht unabhängige Ereignisse sind. Zutreffender wäre es wohl, ganz allgemein von einer Änderung des Zellpopulationswachstums nach der Bestrahlung zu sprechen. In der Arbeitsgruppe um Professor Richter-Landsberg, wo die OLN-93 Zelllinie entwickelt und etabliert wurde, wurde eine Verdopplungszeit von unbehandelten OLN-93 Zellen zwischen 16 bis 18 Stunden ermittelt (Richter-Landsberg and Heinrich, 1996). Ein langfristige Effekt von ionisierender Strahlung auf das Wachstum der OLN-93 Zellpopulation ist nicht ersichtlich, da am Tag 8 (192 Stunden) die Zellzahl von bestrahlten und unbestrahlten in etwa gleich ist. Am ersten Tag der Zählung befinden sich Zellen, wie erwartet, in der Wachstum-Anlaufphase. Zu dem Zeitpunkt kann bei der unbestrahlten Zellpopulation deutlicher Zellzahlanstieg beobachtet werden, während bei bestrahlten Zellen eine leichte Zellzahlabnahme verzeichnet wurde. Dieses kann als

Nachweis für apoptotische Aktivitäten in bestrahlter Zellpopulation am Tag 1 nach der Bestrahlung gesehen werden.

4.3.5 Metabolische Aktivität von Zellen

Die metabolische Aktivität der Zellen kann mit Hilfe Alamar-Blue Assay analysiert werden. Dabei handelt es sich um einen nicht fluoreszierenden, wasserlöslichen, nicht toxischen, Zellmembran permeablen Farbstoff, auch bekannt als Diazo-Resorcinol, Azoresorcin, Resazoin oder Resazurine. In die Zelle aufgenommen, fungiert der Farbstoff als Elektronakzeptor. Aufgrund seines Redoxpotentials kann Alamar-Blue durch unterschiedliche zelluläre und mitochondriale Moleküle und Enzyme reduziert werden, weshalb dieses nicht als Indikator für mitochondrialen, sondern für zelluläre metabolische Aktivität anzusehen ist. Durch Reduktion wird das Alamar-Blue zu rosafarbenem und fluoreszierendem Resorufin umgewandelt. Die zelluläre metabolische Aktivität wird oft als Maß für die Zellvitalität diskutiert (Gray and Wickstrom, 1996; Rampersad, 2012).

Die zelluläre metabolische Aktivität mit Alamar-Blue Assay in bestrahlten OLN-93 Zellen wurde im Vergleich zu unbestrahlten Zellen analysiert. Dafür wurden je 5×10^4 unbestrahlte oder bestrahlte Zellen in 96 Lochplatten ausgesät. Nach dem die Zellen adhären wurden, erfolgte die Inkubation mit Alamar-Blue Lösung für 4 Stunden bei 37 °C. Die Fluoreszenzmessungen ($\lambda=585$ nm) erfolgten am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd als Triplikaten. Die grafische Darstellung der Auswertung vom Alamar-Blue Assay ist in der Abbildung 57 zu sehen.

Die Alamar-Blue Analyse von bestrahlten, im Vergleich zu unbestrahlten OLN-93 Zellen zeigt eine ca. 55 %-ige Abnahme in der metabolischen Aktivität etwa 24 Stunden nach der Bestrahlung. Aufgrund großen, zum Teil überlappenden Standardabweichungen können für spätere Zeitpunkte, ausgenommen Tag 8 nach Bestrahlung, keine eindeutigen Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben erkannt werden. Am Tag 8 nach der Bestrahlung kann eine tendenzielle Erhöhung der metabolischen Aktivität in bestrahlten Zellen beobachtet werden. Diese Beobachtung kann anhand am Tag 8 (192 Stunden) verzeichneten Wachstumsverhaltens der beiden Zellpopulationen erklärt werden (siehe Abbildung 56). Zu dem Zeitpunkt kann bei den unbestrahlten OLN-93 Zellpopulationen bereits die Absterbephase des Wachstums beobachtet werden, während bei den bestrahlten Zellen weiterhin eine Zellzahlzunahme detektiert wurde. Allerdings ist dieser Effekt nicht eindeutig als strahlungsbedingt zu betrachten, da die Absterbephase und somit auch verminderte metabolische Aktivität in unbestrahlten Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit durch Faktoren wie Populationsdichte und Nährstoffmangel hervorgerufen wurde. Die drastische Abnahme

der metabolischen Aktivität in den Zellen am Tag 1 nach der Bestrahlung könnte die erwartete Reduzierung der Vitalität von Zellen direkt nach den strahlungsinduzierten Schäden andeuten. Auch diese Interpretation stimmt mit beobachtetem Wachstumsverhalten der bestrahlten Zellpopulation am Tag 1 überein. Die Zellen sind offensichtlich so stark geschädigt, dass die Mitosefähigkeit herabgesetzt und/oder die Apoptoserate erhöht wird. Die Stoffwechselfunktion der Zellen ist eingeschränkt, was sich in einer verringerten Vitalität, nach Alamar-Blue Analyse, darstellt.

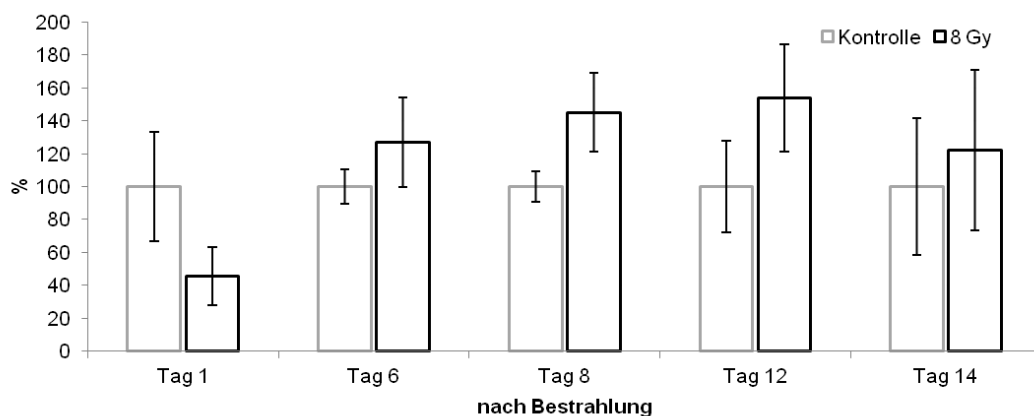


Abbildung 57: Analyse der metabolischen Aktivität von OLN-93 Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkung von ionisierender Strahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Röntgenstrahlung) in einer Zeitspanne von 14 Tagen. Durch die Reduktion von Alamar-Blue durch intrazelluläre Reduktionsäquivalenten und Enzyme entsteht das fluoreszierende Resorufin. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in bestrahlten Proben sind stets im prozentuellen Verhältnis zu entsprechenden Kontrollen gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3). Am Tag 1 nach der Bestrahlung kann eine 2,2-fache (55 %-ige) Abnahme der metabolischen Aktivität in bestrahlten Zellen beobachtet werden. Tendenzielle Abnahmen sind an Tag 6, 8 und 12 erkennbar.

4.3.6 Endozytosolische Aktivität von Zellen

Der nicht membranpermeable Farbstoff Neutralrot wird nur von lebenden, vitalen Zellen über die Endozytose aufgenommen und hauptsächlich in den Lysosomen gespeichert. Bei Zellschädigungen reduziert sich die Farbstoffaufnahme der Zellen, was photometrisch erfasst werden kann und erlaubt einen Rückschluss auf die endozytosolische Aktivität der Zellen. Die Analyse der endozytosolische Aktivität der Zellen mittels Neutralrot wird oft als Maß für die Vitalität von Zellen genutzt (Borenfreund et al., 1988; Lowik et al., 1993; Modha et al., 1993).

In Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der Bestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy (Röntgenstrahlung) auf die endozytosolische Aktivität von OLN-93 Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung analysiert. Dafür wurden je 5×10^4 unbestrahlte und bestrahlte

Zellen in Triplikaten in 96 Lochplatten ausgesät. Die Zellen wurden mit der Neutralrotlösung für 2 Stunden inkubiert (siehe Abschnitt 3.5.6). Die Messungen erfolgen am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd.

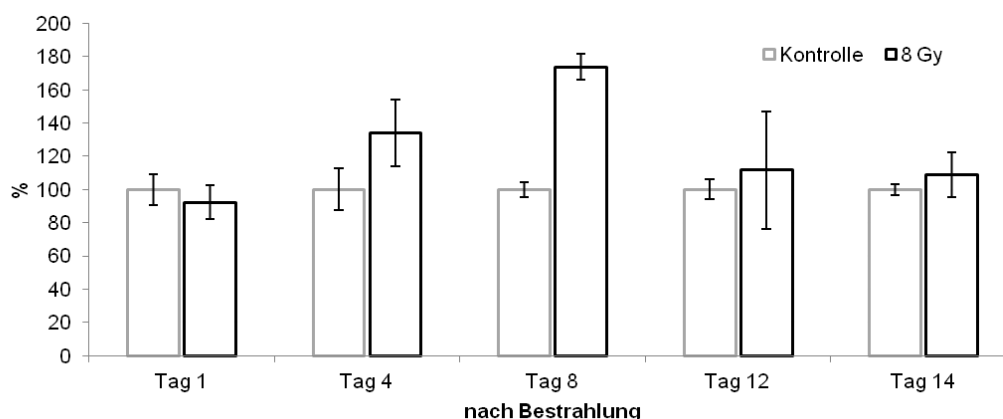


Abbildung 58: Analyse von endozytosolischen Aktivitäten in bestrahlten OLN-93 Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung mit Neutralrot. Der Farbstoff Neutralrot wird durch Endozytose von Zellen aufgenommen. Geschädigte Zellen weisen verringerte Farbstoffaufnahme auf. Photometrische Detektion des aufgenommenen Farbstoffs erfolgt am *ELISA-Reader, infinite M1000* von Tecan Group Ltd (ex./em. $\lambda=530$ / $\lambda=645$ nm). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3). An Tag 4 und 8 nach der Bestrahlung kann in bestrahlten Zellen erhöhte endozytosolische Aktivität gefunden werden.

Verglichen zu der Kontrolle geht aus der Grafik hervor, dass die endozytosolische Aktivität von bestrahlten Zellen sich am Tag 3 um über 30 % und am Tag 8 um über 70 % erhöht. Für andere Zeitpunkte der Analyse können keine Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen beobachtet werden.

Am Tag 8 nach der Bestrahlung verzeichneter Anstieg korreliert mit, zu dem Zeitpunkt, gezeigtem Anstieg im Alamar-Blue Assay. Wie bereits gesagt, könnten die am Tag 8 beobachteten Effekte nicht ausschließlich durch die Einwirkung von Bestrahlung hervorgerufen werden, da hier die Faktoren wie Nährstoffmangel und Zellpopulationsdichte ebenfalls wichtige Rolle spielen können. In der Literatur ist Neutralrot-, wie auch Alamar-Blue Assay oft als die Methoden der Wahl für die Analysen der Vitalität der Zellen beschrieben. Anhand hier gezeigten Daten kann gesagt werden, dass dieses nur bedingt zutrifft. So kann im Alamar-Blue Assay gezeigte starke Abnahme in der metabolischen Aktivität und somit auch in der Zellvitalität am Tag 1 nach der Bestrahlung nicht bei der Neutralrot Assay bestätigt werden. Die Zellvitalität ist ein Überbegriff, welcher durch mehrere unterschiedliche zelluläre Eigenschaften beeinflusst bzw. reflektiert wird. Diese Eigenschaften können zusätzlich Zelltyp-abhängig variieren. Aus diesem Grund sollten die diversen Methoden zur Analyse von „Vitalität“ in erster Linie auf das tatsächliche Untersuchungsgebiet, wie z. B.

endozytosolische oder metabolische Aktivität und nicht auf die Zellvitalität direkt bezogen und interpretiert werden.

5 Zusammenfassende Diskussion

Die meisten Studien zur Untersuchung von Effekten der ionisierenden Strahlung auf Zellen befassen sich mit Schädigungen der nuklearen DNA und mit Effekten auf darauf folgende DNA Reparaturprozesse. Im Rahmen meiner Arbeit lag der Schwerpunkt auf Untersuchungen in der Analyse der Strahlungsantworten der Zelle in der Protein- und Lipid-Ebene, insbesondere bezogen auf mitochondriale Proteine und Lipide. Außerdem wurden ausgewählte physiologische Eigenschaften der Zelle nach der Einwirkung von Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 8 Gy analysiert. Die durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen Schäden an Proteinen und Lipiden können zum einen durch direkte (Ionisation durch Strahlung) oder indirekte Wirkung (nach Radiolyse entstandenen ROS Molekülen) entstehen und zum anderen können Expressions- und Funktionsänderungen in Folge von Schädigungen der nuklearen DNA oder mitochondrialen DNA (mtDNA) auftreten. Anders als bei nuklearer DNA, liegen die mtDNA, Proteine und Lipide in der Zelle in mehreren Kopien vor, weshalb meistens nur kumulative Effekte gesehen werden können. Die zahlreichen entstandenen strahlungsinduzierten Schäden an diesen Biomolekülen sind von Molekül zu Molekül verschieden. Die Analysen dieser Effekte von ionisierender Strahlung erfolgten in einer Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung, wobei der erste analysierte Zeitpunkt ca. 24 Stunden nach der Bestrahlung war.

Ein weiterer Punkt, der selten bei den Strahlungsexperimenten an kultivierten Zellen berücksichtigt wird, ist der Sauerstoffgehalt. Auf Grund seiner Bedeutung bei der Strahlungsantwort der Zellen (Adams et al., 1997; Cui, 2012; Harris, 2002; Lyng et al., 2000), könnte der Sauerstoffgehalt bei vielen Experimenten dazu geführt haben, dass die Studien an konventionell kultivierten Zellen nicht mit den *in vivo* Studien an den Organismen oder an Zellen kultivierten unter physiologischen Bedingungen verglichen werden können. Um diese Fragestellung zu klären, greifen einige Forscher bei der Kultivierung von Zellen zu den Bedingungen der realen Hypoxie oder zu diversen chemischen Hypoxie-Nachahmern. Im Rahmen meiner Arbeit wurden einige Experimente unter Einsatz von CoCl_2 , einem der bekanntesten und am häufigsten eingesetzten Hypoxie-Nachahmer (Ardyanto et al., 2006; Chachami et al., 2004; Lee et al., 2013) durchgeführt, um den Effekt vom CoCl_2 auf die Strahlungsantwort der Zellen zu analysieren.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse meiner Arbeit zusammengefasst und diskutiert. Zunächst findet in dem Abschnitt 5.1 ein Resümee der Strahlungsantworten in konventionell kultivierten OLN-93 Zellen statt. Anschließend werden die Strahlungsantworten in CoCl_2 -vorbehandelten OLN-93 Zellen im Abschnitt 5.2 diskutiert. Dabei wird das

Vorhandensein von Hypoxie-nachahmenden-Bedingungen nach dem Einsatz von CoCl_2 kritisch bewertet.

5.1 Effekte ionisierender Strahlung

5.1.1 Effekte ionisierender Strahlung auf die Proteine der Atmungskette

Im Vordergrund dieser Arbeit standen die Analysen des mitochondrialen Proteoms und Lipidoms in Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen mit Röntgenstrahlung (8 Gy). Mit Hilfe der quantitativen Proteinmengen-Analysen mittels 2D-BN/SDS Elektrophorese und Delta2D densitometrischer Auswertung konnten die Mengen von einigen Untereinheiten der OxPhos-Komplexen und Superkomplexen analysiert werden (siehe Abschnitt 4.1.2). Dabei wurde gezeigt, dass nach der Behandlung von Zellen mit Röntgenstrahlung die Proteinmenge von OxPhos-Untereinheiten verändert wird. So konnte eine strahlungsinduzierte Abnahme der Proteinmenge vom individuellen Komplex III_2 bis zum Tag 11 nach der Bestrahlung anhand der Analyse von der Menge von Core 2 Untereinheit des Komplexes nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13). Ebenso konnte eine Abnahme der Menge von OxPhos-Superkomplexen anhand der Komplex I NADH-Ubichinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit (siehe Abbildung 10), sowie durch die Analyse aller untersuchten Untereinheiten aus Superkomplexen (siehe Abbildung 15) an Tag 1 und 4 nach der Bestrahlung gezeigt werden. Durch die Analysen der Komplex V Untereinheiten konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Menge abhängig von der Bestrahlung detektiert werden, wobei das Öffnen einige Hinweise für eine strahlungsabhängige Abnahmen in der Proteinmenge direkt nach der Bestrahlung erkennbar waren (siehe Abbildung 16 bis Abbildung 30). Eine eindeutige Abnahme bei Komplex V Untereinheiten kann nur bei der β Untereinheit aus freiem F_1 -Teil beobachtet werden (siehe Abbildung 21). Die Anzahl der zur Atmungskette zugeordneten Proteinspots, deren Menge quantitativ analysiert werden konnte, betrug 13, wobei es sich dabei um insgesamt 8 unterschiedliche Untereinheiten handelte. Diese Anzahl ist sehr gering in Anbetracht der Tatsache, dass allein Komplex I aus 46 unterschiedlichen Untereinheiten besteht (Carroll et al., 2003) und die Anzahl der unterschiedlichen Untereinheiten in allen OxPhos-Komplexen ca. 90 beträgt (Dimauro et al., 2004). Die Ursache für diese niedrige Anzahl an Proteinspots in 2D-BN/SDS Gelen die den OxPhos-Komplexen zugeordnet werden können, könnte auf die geringe Menge an mitochondrialen Proteinen in *in vitro* kultivierten Zellen zurück zu führen sein. Ähnliche Ergebnisse mit niedriger Anzahl an Proteinen der Atmungskette wurden an unterschiedlichen Zelltypen bereits beobachtet. So erzielte man mit den Proben aus SH-SY5Y Zellen (nicht veröffentlichte Daten von Viktoria Decker), aus humanen Fibroblasten NHDF, WI38,

AG1522D (Frenzel, 2011) oder auch aus retinalen Ganglienzellen R28 Zellen (Daten von mir, nicht gezeigt) vergleichbare Ergebnisse. Möglicherweise sollte das Aufarbeitungsverfahren für die Zellkulturproben weiter optimiert werden. Die Analysen der Proben aus unterschiedlichsten Geweben und von verschiedenen Organismen ergeben deutlich zufriedenstellendere Ergebnisse bezüglich der Anzahl der Proteine der Atmungskette (Frenzel, 2011; Frenzel et al., 2010; Muschol, 2014; Reifschneider et al., 2006; Schäfer, 2011; Thilmany, 2013).

Zusammengefasst kann dennoch gesagt werden, dass die Einwirkung von ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy) auf die OLN-93 Zellen eine Abnahme der Menge von OxPhos-Komplexen und Superkomplexen verursacht. Die größten Abnahmen konnten am Tag 1 nach der Bestrahlung beobachtet werden. Diese strahlungsabhängigen Abnahmen wurden zu späteren Zeiten nach der Bestrahlung kleiner, bzw. die Proteinmengen in bestrahlten und unbestrahlten Proben glichen sich an. Da die Experimente bei der großen Anzahl der Proben sehr aufwendig sind, konnten im Rahmen dieser Arbeit nur drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt werden, was statistisch signifikante Aussagen erschwert. Daher sollten im Rahmen der Weiterführung des Projekts weitere Wiederholungen durchgeführt werden, um meine Ergebnisse zu verifizieren.

Weitere Analysen bezüglich der Atmungskettenproteine befassten sich mit der Aktivität der Komplexe I und IV (siehe Abschnitt 4.1.3 und 4.1.4). Der bereits oben beschriebene Effekt von Röntgenstrahlung auf die Proteinmenge muss nicht zwangsläufig eine Auswirkung auf die Physiologie der Zelle haben. Die Abnahmen in der Proteinmenge können durch eine erhöhte spezifische Enzymaktivität kompensiert werden. Die Analysen der relativen Aktivität des Komplexes I in bestrahlten OLN-93 Proben im Vergleich zu unbestrahlten Proben zeigen (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38) die Abnahmen in den gesamten Aktivitäten - sowohl für den individuellen Komplex, als auch für Komplex I in Superkomplexen. Dabei konnte beobachtet werden, dass diese Abnahmen für den individuellen Komplex stärker sind als für den Komplex I in Superkomplexen. So fielen z.B. die relativen Aktivitäten für den individuellen Komplex I am Tag 1 nach der Bestrahlung auf ca. 40 % und die relativen Aktivitäten vom Komplex I in Superkomplexen auf ca. 70 % der Aktivität in unbestrahlten Proben. Ein Grund für die dominanteren Abnahmen der Aktivität des individuellen Komplexes könnte die höhere Schädigungsrate durch die ionisierende Strahlung bzw. ROS sein. Möglicherweise ist der Komplex I in Superkomplexen durch die anderen Proteinkomplexe abgeschirmt und wird dadurch weniger geschädigt. Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass die Assemblierung von Komplexen in Superkomplexen deren Stabilität wie auch Aktivität positiv beeinflusst (Schafer et al., 2006). Die Ursachen für die relativen

Aktivitätsabnahmen von Komplex I in beiden Assemblierungsformen könnten sowohl durch eine Verminderung der spezifischen Enzymaktivität, als auch durch den Abbau oder die verminderte Expression von Komplex I Untereinheiten hervorgerufen werden.

Die Analysen von relativen Aktivitäten des Komplexes IV (siehe Abbildung 40 und Abbildung 41) zeigen in bestrahlten Proben verglichen zu unbestrahlten Proben ein Zunahme der Aktivität sowohl für den individuellen Komplex als auch für den Komplex in Superkomplexen (ausgenommen Tag 11 nach der Bestrahlung). Somit konnte gezeigt werden, dass nach der Einwirkung ionisierender Strahlung die Aktivitäten von diesen beiden Komplexen nicht gleich reguliert wird. Mögliche Ursache hierfür könnte die strikte Regulierung der Aktivität von Komplex IV sein, welcher in der Regulation des gesamten Prozesses der oxidativen Phosphorylierung eine wichtige Rolle spielt (Kadenbach, 1986). Somit könnten durch eine Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität die Zunahmen in der Gesamtaktivität des Komplexes IV entstehen. Möglicherweise kompensiert die Zelle durch die Erhöhung der Komplex IV Aktivität zum einem die reduzierte Proteinmenge (die Mengen von Komplex IV Untereinheiten konnten nicht analysiert werden) und zum anderen könnte die Zelle durch die Erhöhung der Komplex IV Aktivität für die Aufrechterhaltung von elektrochemischem Potential über die innere mitochondriale Membran, trotz der Abnahmen in der Aktivität von Komplex I, sorgen. Komplex IV ist ein Schlüsselenzym der Atmungskette und stellt den einzigen irreversiblen Reaktionsschritt der oxidativen Phosphorylierung dar (Kadenbach, 1986). Die Aktivität dieses Komplexes kann aus diesem Grund besonders sensibel und schnell reguliert werden (Acin-Perez et al., 2011; Cooper and Davies, 2000). Dieses erklärt die rasche Zunahme der Aktivität für den Komplex IV am Tag 1, wie auch die am Tag 11 beobachteten kurzfristigen Abnahmen der relativen Aktivität in bestrahlten Proben. Die Zunahmen von Komplex IV Aktivitäten in Abhängigkeit der Bestrahlung an Tag 1, 4, 7 sind für den Komplex IV in Superkomplexen größer (120 % bis 630 % der Aktivität in unbestrahlten Proben), als für den individuellen Komplex (116 % bis 300 % der Aktivität in unbestrahlten Proben). Hierbei könnte ebenso wie bei dem Komplex I die räumliche Abschirmung durch die anderen Komplexe in Superkomplexen zu einer geringeren Schädigung des Komplexes IV geführt haben, wodurch die Komplex IV Menge in Superkomplexen weniger reduziert worden sein könnte.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ionisierende Strahlung mit einer Dosis von 8 Gy die Proteine der Atmungskette beeinflusst. In der Zeitspanne von 14 Tagen nach der Bestrahlung der Zellen konnten Änderungen in den Proteinmengen von individuellen Komplexen und Superkomplexen, wie auch in den enzymatischen Aktivitäten beobachtet werden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass

die ionisierende Strahlung einen Effekt auf die oxidative Phosphorylierung, die Hauptquelle für ATP, hat.

5.1.2 Effekte ionisierender Strahlung auf die Hitzeschockproteine

Die Analyse von Proteinmengen mittels 2D-BN/SDS Elektrophorese und anschließender densitometrischer Auswertung der Proteinspots mittels Delta2D Software erfolgten an mitochondrialen Proben. Bei der Isolierung von Mitochondrien handelt es sich um eine „*crude*“ Isolierungsmethode, bei der Kontaminationen mit Proteinen aus allen Zellkompartimenten auftreten können. Der Vorteil dieser Methode ist die schonende Isolierung von Mitochondrien, bei der strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Proteine und Lipide aufrecht erhalten bleiben. So konnten im Rahmen dieser Arbeit die Proteinmengen von drei Hitzeschockproteinen (HSPs) analysiert werden (siehe Abschnitt 4.1.2), wobei es sich bei zwei dieser Proteine laut Literatur um nicht mitochondriale Proteine handelt (Arrington and Schnellmann, 2008; Ou et al., 2014; Ozawa et al., 2001). HSPs sind stark an der Steuerung von zellulären Prozessen unter Stressbedingungen involviert (Arya et al., 2007; De Maio, 1999). Insbesondere interessant sind deren Teilnahmen in der Inaktivierung und Aktivierung von Apoptosewegen (Arya et al., 2007; De Maio, 1999; Gabai et al., 2005; Kim and Kim, 2011; Pandey et al., 2000; Wu et al., 2014). Zweifelfrei konnten die Proteinspots für das mitochondriale HSP60, zytosolische HSP90 β und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Hsp70 Protein in den 2D-BN/SDS Gelen zugeordnet und anschließend ausgewertet werden.

Die Analyse der Menge von mitochondrialem HSP60 Protein zeigte eine Zunahme in der Proteinmenge in bestrahlten Proben verglichen zu unbestrahlten Proben an Tag 1 (50 %) und Tag 4 (30 %) nach der Bestrahlung (siehe Abbildung 32). Dem HSP60 werden sowohl pro-apoptotische (Faried et al., 2004), als auch anti-apoptotische (Veereshwarayya et al., 2006) Eigenschaften zugeschrieben.

Eine Zunahme in der Proteinmenge von HSP90 β , welches eines der zwei bekannten Isoformen von HSP90 ist, konnte ebenso an Tag 1 (20 % bis 90 %) und Tag 4 (5 % bis 40 %) nach der Bestrahlung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33). Somit konnte gezeigt werden, dass die HSP90 β Expression, anders als durch Hitzestress (Ou et al., 2014), strahlungsinduziert erhöht wird. Das HSP90 ist ein stark exprimiertes Protein in der Zelle und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von karzinogenen und neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. bei der Alzheimer Demenz (Luo et al., 2008). Weiterhin stabilisiert HSP90 die Proteine Raf-1, Akt und ErbB2, die wiederum an den anti-

apoptotischen Prozessen, die der Strahlentherapie entgegen wirken, involviert sind. (Pandey et al., 2000; Wu et al., 2014).

Anders als für die HSP60 und HSP90 β Proteine, konnten für das Hyou1 Protein, ein Mitglied der HSP70 Proteinklasse, unveränderte Mengen in bestrahlten, verglichen zu unbestrahlten Proben, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 34). Die Funktion von Hyou1 ist weitgehend unbekannt, dennoch wird dem Protein eine anti-apoptische Wirkungsweise zugeschrieben (Arrington and Schnellmann, 2008). Weiterhin wurden Zusammenhänge zwischen Tumorwachstum und Überexpression vom Hyou1 Protein beobachtet (Ozawa et al., 2001). Das Protein ist stark glycosyliert und ist bekannt als ein Chaperon, ausschließlich lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum. Allerdings wurden bereits Hypothesen aufgestellt, wie auch Indizien gefunden, dass das Protein Hyou1 auch in Mitochondrien exprimiert wird (Arrington and Schnellmann, 2008). Die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführte quantitative Analyse der Proteinmenge zeigte, dass das Hyou1 Protein nach der Sypro Ruby Färbung in 2D-BN/SDS Gelen einen beachtlichen Proteinspot darstellt. Diese Beobachtung unterstützt die von Arrington und Schnellmann (2008) aufgestellte Hypothese über die mitochondriale Expression des Hyou1 Proteins.

Ebenfalls auf Grund seines beachtlichen Vorkommens im Spot in 2D-BN/SDS Gelen stellt sich die Frage, ob das HSP90 β Protein auch in Mitochondrien exprimiert wird. Um diese Fragen eindeutig beantworten zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zusammengefasst konnte im Rahmen der quantitativen Analyse der Proteinmenge nachgewiesen werden, dass die HSP60 und HSP90 β Proteine in OLN-93 Zellen strahlungsinduziert bis zum Tag 4 nach der Bestrahlung in OLN-93 Zellen überexprimiert werden, während die Menge von Hyou1 Protein bis zum Tag 14 nach der Bestrahlung unverändert bleibt.

5.1.3 Die Effekte ionisierender Strahlung auf die Lipide

Die Erhöhung von Permeabilität der mitochondrialen Membran ist ein initiales Ereignis bei der Aktivierung von Apoptose (Green and Reed, 1998; Park et al., 2005). Die Permeabilität von Membranen korreliert mit der Beweglichkeit der Membranbestandteile bzw. mit der Membranfluidität (Lande et al., 1995). Die Membranfluidität kann die Dynamik aller membranabhängigen Transportvorgänge sowie membranassoziierte Enzymreaktionen beeinflussen. Kommt es zu Veränderungen der Membranfluidität, können auch diese Prozesse stark beeinträchtigt werden. Im Rahmen meiner Arbeit wurde der Effekt von Röntgenstrahlung auf die mitochondriale Membranfluidität an isolierten, intakten

Mitochondrien in den ersten 14 Tagen nach der Bestrahlung mit Hilfe von Fluoreszenz-Anisotropie der DPH-Sonde analysiert. Dabei konnte eine strahlungsabhängige Abnahme der Fluoreszenz-Anisotropie der DPH-Sonde zu allen analysierten Zeiten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 42). Da die Fluoreszenz-Anisotropie umgekehrt proportional zur Beweglichkeit der Moleküle, bzw. zu der Membranfluidität ist, bedeutet deren Abnahme eine Zunahme in der Membranfluidität nach der Einwirkung von Röntgenstrahlung auf die Zelle mit einer Dosis von 8 Gy. Die Erhöhung von Fluidität könnte die Permeabilität der mitochondrialen Membranen erhöhen, wodurch die oxydative Phosphorylierung und somit die Synthese von ATP durch Abnahme des elektrochemischen Potentials über die innere Membran gehemmt werden könnte (siehe Abschnitt 4.3.3; Strahlungsabhängig konnte eine Erhöhung von ATP beobachtet werden). Weiterhin könnten durch erhöhte Fluidität funktionelle Veränderungen der OxPhos-Enzyme auftreten, aber auch deren Stabilität und Assemblierung in Superkomplexe könnte auf Grund erhöhter lateraler Diffusion beeinflusst werden. Nicht zu vergessen ist die in Folge der erhöhten Membranpermeabilität eintretende Freisetzung vom Cytochrom c und Aktivierung von Apoptose. Die ermittelten Unterschiede in der Membranfluidität sind zu allen analysierten Zeitpunkten auf der Absolut-Skala gering. Die gemessenen Anisotropie-Werte der unbestrahlten und bestrahlten Proben unterscheiden sich im Durchschnitt um 0,02. Diese Unterschiede sind aber statistisch höchst signifikant (siehe Abbildung 42 B) und physiologisch relevant. Die theoretisch minimalen und maximalen Anisotropie-Werte für DPH Fluoreszenzsonde betragen 0,0 und 0,4, wobei der 0,0-Wert die isotrope, sich schnell bewegende und 0,4 die unbewegliche DPH-Sonde beschreibt (Dencher, 1990; Sugawa et al., 1996). Die beobachteten Unterschiede von 0,02 bedeuten somit 5 % der gesamten absoluten Anisotropie-Skala. Unterschiede von 0,01 (2,5 % der absoluten Anisotropie-Skala) in den Anisotropie-Werten wurden von Sugawa et al. (1996) in der Studie zu Analyse der Membranfluidität im Laufe des Alterungsprozesses an Wistar-Kyoto-Hirngewebe detektiert, wobei die Membranfluidität in Gewebe aus „alten“ im Vergleich zu „jungen“ Tieren abnahm (Sugawa et al., 1996). Dies verdeutlicht die physiologische Relevanz der im Rahmen meiner Arbeit detektierten Unterschiede von 0,02 nach der Bestrahlung. Allerdings wird im Vergleich zum Alterungseffekt die Fluidität durch die ionisierende Strahlung in entgegengesetzte Richtung beeinflusst. Um die physiologische Relevanz weiter zu verdeutlichen kann als ein Vergleich noch hinzugefügt werden, dass eine solche Abnahme der DPH-Fluoreszenz-anisotropie durch eine 2,5 %-ige Verringerung der Cholesterol-Menge (Cholesterol zu Gesamtlipid) erreicht wird (Kern, 2013b).

Zusätzlich zu Analysen der Membranfluidität von isolierten, intakten Mitochondrien wurden die Untersuchungen über die Zellmembranfluidität an intakten Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlung durchgeführt. Dabei zeigten die Analysen mit der stark lipophilen und geladenen

DPH-Sonde, wie auch die Analyse mit der weniger stark lipophilen TMA-DPH-Sonde, dass die ionisierende Strahlung keinen Einfluss auf die Zellmembranfluidität hat (siehe Abbildung 43 und Abbildung 44). Bei den Messungen mit der DPH-Sonde kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Anteil der lipophilen DPH-Moleküle die Zellmembran durchdringt und sich in intrazelluläre Membransysteme einlagern. Die TMA-DPH-Sonde dagegen besitzt eine kationische Gruppe, mit der sie in Wechselwirkung mit der anionischen Zellmembranoberfläche steht und somit nicht durch die Membran zu den Zellorganellen diffundieren kann. Auf Grund dieser Wechselwirkung mit der Zelloberfläche sind TMA-DPH Moleküle in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, weshalb die gemessenen Anisotropie-Werte für TMA-DPH höher als die Anisotropie-Werte der DPH-Sonde ausfallen. Die unveränderte Membranfluidität der Zellmembran nach der Bestrahlung könnte durch das in der Membran reichlich vorhandene Cholesterol erklärt werden. Cholesterol ist zwischen Fettsäureresten eingelagert und schränkt auf diese Weise, trotz strahlungsinduzierten Schäden der Membranbestandteile, die Membranfluidität ein. Die mitochondrialen Membranen sind reich an Cardiolipin, welcher durch seine zahlreichen Doppelbindungen besonders anfällig für die ROS induzierten Schäden ist (Paradies et al., 2011). Sie sind dagegen cholesterolfrei, weshalb die Fluidität schlechter reguliert bzw. gepuffert werden kann. Eine weitere Erklärung für die unbeeinflusste Fluidität der Zellmembran nach der Bestrahlung könnte ein niedrigere Sättigungsgrad der in Zellmembran befindlichen Fettsäuren verglichen zu mitochondrialen Membranen sein, wodurch diese auch weniger geschädigt wären.

Weiterhin konnten im Rahmen der Etablierung der Methode zur Analyse der Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen an intakten Mitochondrien nach Angelini et al. (Angelini et al., 2012; Kern, 2013b; Muschol, 2014) Mitochondrien aus bestrahlten OLN-93 Zellen im Vergleich zu Mitochondrien aus unbestrahlten Zellen analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ionisierende Strahlung keinen Effekt auf die Lipidzusammensetzung von mitochondrialen Membranen hat.

Zusammengefasst konnte durch die durchgeführten Analysen des Lipidoms gezeigt werden, dass die durch die ionisierende Strahlung hervorgerufenen Schäden der Membranbestandteile die Fluidität der mitochondrialen Membranen erhöhen, aber nicht die der Zellmembran. Die Zunahmen in der Fluidität der mitochondrialen Membranen bleiben innerhalb von 14 Tagen nach der Bestrahlung bestehen und nehmen mit der Zeit nach der Bestrahlung, anders als die meisten anderen strahlungsinduzierten Veränderungen, wie z. B. Erhöhungen von der Proteinmenge einiger Proteine (siehe Abschnitt 4.1.2) oder Zunahme der ATP Menge (siehe Abschnitt 4.3.3), nicht ab. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob die Zunahme in der Fluidität der mitochondrialen Membranen ein bleibender, bzw.

langfristiger Effekt der ionisierenden Strahlung auf die OLN-93 Zellen ist. Aus diesem Grund wäre die Durchführung einer Langzeitstudie in diesem Zusammenhang in Zukunft empfehlenswert. Außerdem könnten die Analysen des antioxidativen Systems der Zellen, bezüglich der Expressionsmenge der Proteine und bezüglich eventueller Schädigungen dieser durch die Einwirkung von ionisierender Strahlung, wichtige Erkenntnisse liefern.

5.1.4 Effekte ionisierender Strahlung auf physiologische Aktivitäten der Zellen

Um einen Einblick in die Änderungen des physiologischen Zustands von OLN-93 Zellen nach Einwirkung ionisierender Strahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy) zu gewinnen, wurden Analysen von ROS Mengen, mitochondrialem Membranpotential, ATP Konzentration, Wachstum der Zellpopulation, metabolischer und endozytosolischer Aktivität durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (ausgenommen der Untersuchung der endozytosolischen Aktivität) zeigten am Tag 1 nach der Bestrahlung die stärksten Veränderungen. Aus diesem Grund werden zuerst nur die am Tag 1 nach der Bestrahlung beobachteten Befunde zusammengefasst und diskutiert. So konnten am Tag 1 nach der Bestrahlung eine Erhöhungen von den ROS (siehe Abschnitt 4.3.1) und ATP Mengen (siehe Abschnitt 4.3.3), wie auch ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential (siehe Abschnitt 4.3.2) beobachtet werden. Die Analyse der metabolischen Aktivität zeigte eine Abnahme verglichen zu unbestrahlten Proben (siehe Abschnitt 4.3.5) und die Wachstumsanalyse der Zellpopulation ergab eine Reduzierung der Zellzahl (siehe Abschnitt 4.3.4). Zum selben Zeitpunkt konnten bei der Analyse der endozytosolischen Aktivität der Zellen keine strahlungsinduzierte Wirkung nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.3.6). Das erhöhte mitochondriale Membranpotential in Zusammenhang mit der erhöhten ROS Menge in den Zellen ist ein Erkennungszeichen für die extrinsische Apoptose oder Nekrose (Banki et al., 1999; Fernandez and Perl, 2009; Nagy et al., 2007), wobei nekrotischer Zelltod bei einem ATP Defizit eintritt. Der am Tag 1 nach Bestrahlung beobachtete physiologische Zustand in Zellen weist auf die Induktion von dem extrinsischen Apoptoseweg hin, da gleichzeitig ein starker Anstieg der ATP Menge (400 % bis 500 % verglichen zu unbestrahlter Probe) detektierbar war. Diese Schlussfolgerung untermauert die im Rahmen der Wachstumsanalyse von bestrahlten OLN-93 Zellen detektierte Zellzahlabnahme, wie auch die Verminderung von metabolischer Aktivität am Tag 1 nach der Bestrahlung. Genau wie Apoptose sind auch die DNA-Reparaturprozesse ATP-abhängig. Dies könnte eine weitere Ursache für das erhöhte mitochondriale Membranpotential und die stark gestiegene ATP Menge in den Zellen sein. Möglicherweise werden in der Zelle metabolische Prozesse, Teilung und sonstige ATP-verbrauchende Prozesse gehemmt, um ausreichend Energie für

die Reparaturprozesse sicher zu stellen. Am wahrscheinlichsten spiegeln die Ergebnisse der Untersuchungen vom physiologischen Zustand der bestrahlten OLN-93 Zellen eine Kombination aus vielen zellulären Ereignissen wider, wobei DNA Reparaturprozesse und Apoptose zwei der wichtigsten Ereignisse direkt nach der Bestrahlung sein könnten. Die Priorität der Zelle nach den strahlungsinduzierten Schäden der DNA könnte bei dem Erhalt von genomischen Informationen liegen.

Die strahlungsinduzierten Änderungen bei den meisten Untersuchungen wurden nach dem Tag 1 bis zum Tag 14 nach der Bestrahlung kleiner, bzw. verschwanden oder kehrten sich sogar um. Anders konnte bei der ROS Analyse außer am Tag 1 noch an Tag 10 und 14 ebenfalls die strahlungsinduzierten Zunahmen (siehe Abbildung 51) beobachtet werden. Die größte Zunahme, von ca. 69 % im Vergleich zu unbestrahlten Proben, wurde am Tag 10 detektiert. An Tag 3 und 8 konnte eine vergleichbare ROS Menge in bestrahlten und unbestrahlten OLN-93 Zellen beobachtet werden. Die durch die Radiolyse entstandenen ROS Moleküle haben extrem kurze Lebensdauer und diffundieren nur ca. 4 nm lang bevor sie reagieren (Roots and Okada, 1972). Die Mengen von sekundär entstandenen ROS Molekülen sollte mit der Zeit, nach der Bestrahlung abklingen. Die beobachtete strahlungsinduzierte Erhöhung der ROS Menge, zu späten Zeitpunkten nach der Bestrahlung, könnte zum einen aus strahlungsabhängigen Defiziten in dem antioxidativen System der Zellen resultieren. Zum anderen könnte eine strahlungsinduzierte Aktivierung von Signalkaskaden stattgefunden haben, wodurch die ROS Produktion durch physiologische Prozesse erhöhte wurde (Kam and Banati, 2013). Einige Studien postulieren den spät-strahlungsinduzierten ROS Anstieg in Folge der mitochondrialen Dysfunktion oder/und durch die erhöhte NADPH-Oxidase Aktivität (Datta et al., 2012; Hosoki et al., 2012; Leach et al., 2001; Zhou et al., 2014). Die bis zum Tag 14 nach der Bestrahlung bestehende Zunahme der ROS Menge in den Zellen korreliert mit erhöhter Fluidität der mitochondrialen Membran. Ebenfalls, vor allem an Tag 1 und 4, konnten strahlungsinduzierte Änderungen in der Abundanz von OxPhos-Enzymen wie auch in deren Aktivität beobachtet werden. Diese Befunde könnten als Indizien für die spät-strahlungsinduzierte mitochondriale Dysfunktion in mit Röntgenstrahlung (8 Gy) behandelten OLN-93 Zellen betrachtet werden. Die mitochondriale Dysfunktion mit der Verminderung von oxidativer Phosphorylierung und die erhöhte Freisetzungsrates von ROS wurden im Zusammenhang mit strahlungsinduzierten Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) diskutiert (Kam and Banati, 2013; Prithivirajasingh et al., 2004). Leach et al. (2001) vermuteten die Mitochondrien als die mögliche Hauptquelle für die spät-strahlungsinduzierte ROS Akkumulation. Begründet wurde dies durch die Tatsachen, dass die Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen den wichtigsten ROS Produktionsort der Zelle darstellen und außerdem je nach Zelltyp 4 % bis

25 % des zellulären Volumens ausmachen können (Leach et al., 2001). Die strahlungsinduzierten Schäden an mitochondrialer DNA stellen viele unterschiedliche Mutationen dar und sind auf Grund zahlreicher zirkulärer Kopien von mtDNA (2 bis 10 pro Mitochondrium) wie auch auf Grund zahlreicher Mitochondrien in einer Zelle (bis zu 1000 in einer humaner Zelle) nicht eindeutig zu detektieren oder zu quantifizieren (Prithivirajsingh et al., 2004). Da mtDNA keine Introns aufweist, führen Mutationen immer zu einer Beeinträchtigung von Genprodukten. Als ein Marker für oxidative Schäden der mtDNA im Rahmen des Alterungsprozesses, der neurodegenerativen Erkrankungen, wie auch nach ionisierender Strahlung gilt die sogenannte „common deletion“, der Verlust von spezifischen 4977 bp des mitochondrialen Genoms (Kam and Banati, 2013; Prithivirajsingh et al., 2004; Schilling-Toth et al., 2011; Wang et al., 2007). Prithivirajsingh et al. zeigten eine Dosis unabhängige Akkumulation von „common deletions“ in der mitochondriale DNA die erst ab Tag 3 nach der Bestrahlung nachweisbar wurde und mit Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien nicht korrelierte. Weiterhin stellten sie die Hypothese auf, dass die strahlungsinduzierte Apoptoserate und die Akkumulation von mitochondrialen Mutationen miteinander nicht korrelieren (Prithivirajsingh et al., 2004). Somit könnte die spätstrahlungsinduzierte Erhöhung von ROS Menge und die Akkumulation von Mutationen in der mitochondriale DNA einer der wichtigsten Effekte der ionisierenden Strahlung darstellen, insbesondere bezüglich der Spätfolgen. Aus diesem Grund können, als ein Ausblick zu meiner Arbeit und als eine Empfehlung für die Weiterführung des Projekts, weitere ROS Analysen in bestrahlten OLN-93 Zellen wie auch die Analyse der „common deletions“ in mitochondrialer DNA vorgeschlagen werden. Leach et al. (2001) beschreiben die Akkumulationen von Mutationen in mitochondrialer DNA und ROS im Zusammenhang mit Depolarisation von mitochondrialer Membran. Dagegen stellt in meiner Arbeit die bereits diskutierte Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran am Tag 1 die einzige detektierte strahlungsinduzierte Änderung bezüglich des mitochondrialen Membranpotential innerhalb von 14 Tagen dar (siehe Abbildung 52). Bei der Bestimmung von ATP Mengen in bestrahlten und unbestrahlten OLN-93 Zellen konnten in etwa die in der Literatur beschriebenen Mengen im Femtomol-Bereich gemessen werden (Frenzel, 2011, Studie an humanen Fibroblasten). An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass durch diesen Assay nicht die in etwa durch oxidative Phosphorylierung erfolgte ATP Produktion, sondern eher der Energiestatus der Zelle, welches sich aus Produktion und Verbrauch von ATP zusammensetzt, bestimmt wurde. Zwei von drei unabhängigen Bestimmungen der ATP Menge in OLN-93 Zellen zeigten zu allen analysierte Zeitpunkten (Tag 1 bis 14) nach der Bestrahlung einen ATP Anstieg (siehe Abbildung 53 und Abbildung 54), während dieser bei der dritten ATP Analyse nur am Tag 1 beobachtet wurde (siehe Abbildung 55). Zu späteren

Zeiten (Tag 4 bis 14) nach der Bestrahlung zeigten sich bei dem dritten Experiment ähnliche ATP Mengen wie in unbestrahlten Zellen. Bei den beiden anderen Experimenten konnten weiterhin strahlungsabhängige Erhöhungen der ATP Menge (160 % bis 300 %) im Vergleich zu unbestrahlten Proben detektiert werden, aber diese waren geringer als am Tag 1 (400 % bis 500 %). Die Ursache für die Abweichung einer von drei Bestimmungen von ATP Menge an Tag 4 bis 14 nach der Bestrahlung könnte durch eine zufällige strahlungsinduzierte Aktivierung von einem Onkogen oder einer Inaktivierung von einem Tumorsuppressor (Little, 2000) in einzelnen Zellen erklärt werden. Dadurch könnten diese einzelnen Zellklone mit Proliferationsvorteilen die übrigen Zellen in der Population überwachsen. Die erhöhte Proliferationsrate könnte ein Grund für die niedrigere ATP Menge sein. Die Wachstumsanalyse von bestrahlten OLN-93 Zellpopulationen zeigt, neben der Zellzahlreduzierung am Tag 1 einen veränderten Wachstumskurvenverlauf im Vergleich zu unbestrahlten Zellpopulationen (siehe Abbildung 56). Die Berechnungen der Verdopplungszeit der unbestrahlten und bestrahlten Zellpopulationen zeigten eine um Faktor 2 verlängerte Verdopplungszeit der bestrahlten OLN-93 Zellpopulationen. Allerdings unterschieden sich die am Ende des Experiments (192 und 216 Stunden) ermittelten Zellzahlen bei bestrahlten und unbestrahlten Zellpopulationen nicht. Die Analyse von metabolischer und endozytosolischer Aktivität mittels Alamar-Blue und Neutralrot Assays werden oft als die Methoden der Wahl bei der Analyse von Zellvitalität eingesetzt (Borenfreund et al., 1988; Gray and Wickstrom, 1996; Lowik et al., 1993; Modha et al., 1993; Rampersad, 2012). Bei beiden Analysen konnte im Rahmen meiner Arbeit gezeigt werden, dass diese Ergebnisse nur unter Berücksichtigung von tatsächlich untersuchten Eigenschaften der Zellen zu interpretieren sind, da die Vitalität ein Oberbegriff ist, welche durch mehrere zelluläre Eigenschaften in der Summe zu beschreiben ist. Ein erster Hinweis dafür konnte bei der Interpretation von den Ergebnissen am Tag 1 nach der Bestrahlung erkannt werden. Hierbei wurde bei dem Alamar-Blue Assay eine strahlungsabhängige Abnahme der metabolische Aktivität nachgewiesen, während bei dem Neutralrot Assay kein Effekt erkennbar war (siehe Abbildung 57 und Abbildung 58). Würde man diese beiden Methoden als universelle Vitalitätstests betrachten, so würden diese Beobachtungen sich gegenseitig nicht bestätigen. Bei den späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung zeigten bestrahlte OLN-93 Zellen zeitweise erhöhte metabolische und endozytosolische Aktivität im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Allerdings sind diese Änderungen nicht direkt als strahlungsabhängig zu definieren, da Unterschiede bezüglich der Wachstumsfaktoren wie Zellpopulationsdichte und Nährstoffmenge laut Wachstumsanalysen der unbestrahlten und bestrahlten Zellpopulationen anzunehmen sind.

5.2 Effekte von CoCl_2 auf Strahlungsantwort: Hypoxie-nachahmende Bedingung?

Der Begriff Hypoxie beschreibt einen Zustand von Sauerstoffmangel, welcher in den Tumoren sowie im normalen Gewebe und Wunden herrschen kann (Hammond et al., 2014). In den letzten Jahren werden immer öfter die *in vitro* Studien kritisch hinterfragt. Dabei geht es unter anderem um die tatsächliche Sauerstoffkonzentration in Zellen, kultiviert unter konventionellen Bedingungen (Normoxie) mit atmosphärischem Sauerstoffgehalt (21% O_2). Der Sauerstoffpartialdruck der einzelnen Organgewebe ist unterschiedlich (1 % bis 9,5 % (Hammond et al., 2014)). Dagegen findet die *in vitro* Kultivierung von unterschiedlichen Zelltypen meistens bei atmosphärischem Sauerstoffgehalt statt (Sullivan et al., 2006; Tiede et al., 2011). In den letzten zwei Jahrzehnten erweiterten zahlreiche Studien die Erkenntnisse über den Einfluss von Sauerstoff auf die Physiologie der Zellen und auf ihre Strahlungsantwort (Hammond et al., 2014; Zolzer and Streffer, 2002). Die Studien mit ionisierender Strahlung werden oft an kultivierten Zellen durchgeführt, um Erkenntnisse über karzinogene Erkrankungen und Strahlentherapie zu gewinnen. In Anbetracht der Tatsache, dass der Sauerstoffgehalt in soliden Tumoren zwischen 0,1 – 1% liegt (Carmeliet and Jain, 2000), könnte man die gewonnenen Erkenntnisse in vielen Studien an konventionell kultivierten Zellen in Frage stellen. Dabei spielt die Regulierung der Transkriptionsaktivität von Transkriptionsfaktor HIF-1 eine der wichtigsten Rollen. Der HIF-1 Transkriptionsfaktor ist ein Heterodimer bestehend aus HIF-1 α Protein, welches bei Sauerstoffanwesenheit rapide abgebaut wird und stabil exprimiertem HIF-1 β Protein. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Aktivität von HIF-1 durch mehrere unterschiedliche Prozesse erhöht. Neben der Stabilisierung von HIF-1 α findet noch die verstärkte Expression dieses Proteins und die Erhöhung seiner Transkriptionsaktivität statt (Yoshimura et al., 2013). Die Hypoxie-bedingte Stabilisierung von HIF-1 α Protein erfolgt durch die Inaktivierung von Prolyl-Hydroxylasen (PHDs), die das Protein hydroxylieren und somit für den Abbau markieren. Allerdings sind auch weitere Mechanismen zur Stabilisierung von HIF-1 α wie z. B. die Interaktion mit HSP90 bekannt (Yoshimura et al., 2013). Resultat der HIF-1 Stabilisierung ist die Bindung an die sogenannten „*Hypoxia Response Element*“ (HRE) Sequenzen in der DNA und dadurch die Aktivierung oder Inhibierung von mehr als 100 Zielgenen, deren Genprodukte funktionelle Bedeutung in verschiedensten zellulären Prozessen besitzen (Horowitz and Simons, 2008).

Im Rahmen meiner Arbeit wurden einige ausgewählte Experimente unter Einsatz von CoCl_2 durchgeführt. CoCl_2 inhibiert die Hydroxylierung von HIF-1 α durch die Inaktivierung von PHDs und greift somit in den HIF-1 Signalweg ein, ähnlich wie die Hypoxie. Aus diesem Grund spricht man in manchen Studien von CoCl_2 als einen Hypoxie-Nachahmer (engl.:

hypoxia-mimetic) (Ardyanto et al., 2006; Chachami et al., 2004; Lee et al., 2013). Die durchgeführten Analysen über die Wirkung von CoCl_2 in Abhängigkeit von Einwirkung der Röntgenstrahlung (8 Gy) auf die OLN-93 Zellen zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit CoCl_2 die Strahlungsantwort der Zellen beeinflusst. Die Effekte von CoCl_2 konnten bei den Untersuchungen von mitochondrialen Membraneigenschaften, bezüglich der Membranfluidität und Lipidzusammensetzung, wie auch bei den Analysen von ROS Mengen und von Änderungen im mitochondrialen Membranpotential gefunden werden.

Die Behandlung von Zellen mit CoCl_2 bewirkte am Tag 1 nach der Bestrahlung eine geringe, dennoch statistisch signifikante Erhöhung der Fluoreszenzanisotropie der DPH-Sonde in den mitochondrialen Membranen (siehe Abbildung 45 und Abbildung 46), was eine Abnahme in der Fluidität der Membranen widerspiegelt. Im Zusammenhang mit der Bestrahlung konnte bei einem Experiment im Vergleich zur Kontrolle (CoCl_2 unbehandelt und unbestrahlt) ebenfalls eine geringfügige CoCl_2 -abhängige Fluiditäts-Abnahme der mitochondrialen Membranen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 45), während bei dem zweiten Experiment die Fluidität in CoCl_2 behandelten und bestrahlten Proben der Kontrollprobe glich (siehe Abbildung 46).

Die Analyse der Lipidzusammensetzung lieferte Ergebnisse, welche die CoCl_2 -bedingte Fluiditätsabnahme erklären könnten. Hierbei konnte bei den CoCl_2 behandelten Zellen strahlungsunabhängig eine Änderung in der Lipidzusammensetzung beobachtet werden. Die CoCl_2 behandelten Proben zeichneten sich durch den größeren Anteil an den detektierten Lipiden, die aus Fettsäuren mit höherem Sättigungsgrad aufgebaut sind, aus (siehe Abschnitt 4.2.2). Der steigende Sättigungsgrad der Membranlipide korreliert mit der Fluiditätsabnahme der Membran (Brown, 2002).

Die Analyse der ROS Menge zeigte keinen CoCl_2 -abhängigen Effekt in unbestrahlten OLN-93 Zellen. Dagegen konnten Effekte von CoCl_2 bezüglich der Strahlungsantwort beobachtet werden. Die an Tag 1 und 14 beobachtete strahlungsinduzierte Zunahmen in der ROS Menge in CoCl_2 unbehandelten Zellen trat in CoCl_2 behandelten Zellen nicht auf (siehe Abbildung 51). Allein am Tag 8 nach der Bestrahlung ähnelten sich die strahlungsabhängigen ROS Mengen in CoCl_2 unbehandelten und behandelten Proben.

Der bereits beschriebene Effekt von ionisierender Strahlung auf das mitochondriale Membranpotential, die Hyperpolarisation am Tag 1, konnte bei den mit CoCl_2 vorbehandelten Zellen nicht beobachtet werden. (siehe Abbildung 52). Strahlungsabhängig konnte am Tag 3 in CoCl_2 vorbehandelten Zellen eine Depolarisation von Mitochondrien beobachtet werden.

Zusammengefasst kann gefolgert werden, dass die CoCl_2 -Vorbehandlung von Zellen die strahlungsinduzierten Effekte mildert bzw. umkehrt. Dieser Befund entspricht zum Teil der Erwartung für eine Hypoxie-nachahmende Bedingung, da reale Hypoxie ebenfalls, wie aus vielen Studien bekannt ist, entgegen den strahleninduzierten Effekten wirkt (Überleben, erhöhte Toleranz gegenüber ROS, usw. (Curry et al., 2014; Hammond et al., 2014)). Im Einzelnen betrachtet können dennoch Diskrepanzen zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und in der Literatur beschriebenen Effekten der realen Hypoxie erkannt werden. So z.B. konnte bei der Analyse der ROS Menge kein CoCl_2 -induzierte ROS Erhöhung beobachtet werden, während die reale Hypoxie die endogene ROS Produktion, begleitend von einer erhöhten Toleranz gegenüber ROS, induziert (Cairns et al., 2011; Curry et al., 2014). Weiterhin können Effekte von CoCl_2 auf die Lipidzusammensetzung von mitochondrialen Membranen nicht auf der molekularen Ebene verstanden werden und sind ebenfalls ungleich mit den erwarteten Ergebnissen für eine Hypoxie-nachahmende Bedingung. Außerdem ist der Einfluss von CoCl_2 auf die HIF-1 α Stabilität durch die Inaktivierung von PHDs nur eines von vielen Wegen die bei der tatsächliche Abwesenheit von Sauerstoff (reale Hypoxie) zur Stabilisierung dieses Proteins in der Zellen erfolgen. Die Abwesenheit von Sauerstoff erhöht neben der Stabilität noch die Transaktivierungsaktivität wie auch die Translation von HIF-1 α Protein. Weiterhin ist es wichtig zu betonen, dass der Sauerstoff weitere HIF-1-unabhängige Effekte auf die Strahlungsantwort (z.B. Fixierung von DNA Schäden) der Zelle hat, die durch CoCl_2 nicht hervorgerufen werden können. Auf Grund diesen Unstimmigkeiten kann der Einsatz von CoCl_2 als genereller Hypoxie-Nachahmer, insbesondere bei den Fragenstellungen um den Effekt ionisierender Strahlung (besonders bei Strahlen die mit hohem Anteil die Zelle durch indirekte Wirkung schädigen, wie z.B. Röntgenstrahlen) auf die Membraneigenschaften oder auf membranassoziierte enzymatische Prozesse wie oxidative Phosphorylierung nicht empfohlen werden.



Anhang

Identifizierung der Proteine (Abschnitt 4.1.1):

Der im Rahmen der massenspektrometrischen Identifizierung der Proteine erhalten Report ist in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. N. A. Dencher vorhanden.

Analyse der relativen Proteinmenge (Abschnitt 4.1.2):

Gelbilder sind in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. N.A. Dencher hinterlegt und sind in der Masterarbeit von Frau Christine Kern (Kern, 2013a) dargestellt.

Die Excel-Auswertungsmappe, wie auch die Delta2D-Projekte sind ebenfalls in der Arbeitsgruppe Dencher vorhanden.

Die für die dargestellten Grafiken genutzten %-Grauwerte sind in folgenden Tabellen aufgeführt. Die Werte sind auf zwei Nachkommastellen aufgerundet.

Tabelle 3: %-Grauwerte für NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 75kDa (Komplex I in Superkomplexen; Spotnr.: 34/35)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle; #1	4,99	4,30	2,32	2,32	2,00
Kontrolle; #2	5,01	4,66	2,30	2,31	2,00
Kontrolle; #3	4,85	4,49	2,30	2,31	1,89
8 Gy; #1	3,60	2,90	2,80	4,00	3,70
8 Gy; #2	3,52	2,90	2,60	4,52	3,72
8 Gy; #3	3,74	3,06	2,66	3,88	3,63

Tabelle 4. %-Grauwerte für NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 α Subkomplex, Untereinheit 9 (Komplex I in Superkomplexen; Spotnr.: 102)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	4,99	4,30	2,32	2,32	2,00
Kontrolle #2	5,01	4,66	2,30	2,31	2,00
Kontrolle #3	4,85	4,49	2,31	2,31	1,89
8 Gy #1	3,60	2,90	2,80	4,001	3,70
8 Gy #2	3,52	2,90	2,60	4,52	3,72
8 Gy #3	3,74	3,06	2,66	3,883	3,63

Tabelle 5: %-Grauwerte für Core 2 (Komplex III in Superkomplexen; Spotnr.: 82)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	2,86	2,71	1,064	3,85	4,17
Kontrolle #2	3,02	5,39	3,57	3,60	4,31
Kontrolle #3	5,47	4,75	3,16	2,98	2,02
8 Gy #1	2,98	2,83	4,05	2,39	6,89
8 Gy #2	2,63	2,75	3,04	1,93	2,32
8 Gy #3	5,10	3,36	3,02	3,07	3,80

Tabelle 6: %-Grauwerte für Core 2 (individuelle Komplex III₂ Spotnr.: 79)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	2,10	4,04	3,77	4,83	3,49
Kontrolle #2	4,61	2,52	2,89	3,04	3,13
Kontrolle #3	3,25	2,41	1,77	1,69	1,06
8 Gy #1	1,05	1,94	3,30	4,11	4,50
8 Gy #2	0,74	1,16	1,82	2,72	1,94
8 Gy #3	1,68	1,22	1,52	1,33	1,37

Tabelle 7: %-Grauwerte für α Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spotnr.: 55/57)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	13,82	12,94	7,56	15,74	17,82
Kontrolle #2	12,05	12,69	9,27	10,38	10,36
Kontrolle #3	13,50	15,12	6,03	6,21	5,75
8 Gy #1	16,74	13,39	14,16	12,14	15,83
8 Gy #2	9,45	8,70	9,28	5,93	6,78
8 Gy #3	13,12	9,20	9,31	8,20	8,72

Tabelle 8: %-Grauwerte für α Untereinheit vom Komplex V Dimer (Spotnr.: 56/58)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	9,65	8,81	6,05	10,05	6,53
Kontrolle #2	9,25	9,20	7,01	8,50	5,96
Kontrolle #3	8,92	9,72	4,98	4,62	3,29
8 Gy #1	7,08	8,61	10,41	10,82	8,61
8 Gy #2	6,75	5,23	6,67	4,74	5,02
8 Gy #3	9,31	7,24	5,05	6,17	5,83

Tabelle 9: %-Grauwerte für β Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spotnr.: 63/66)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	13,83	12,10	12,35	13,81	21,09
Kontrolle #2	18,14	16,67	10,81	11,16	14,77
Kontrolle #3	13,21	14,00	10,61	10,67	10,63
8 Gy #1	13,24	15,38	14,95	12,51	15,73
8 Gy #2	10,70	10,03	10,23	7,12	8,63
8 Gy #3	13,88	9,09	9,21	9,07	9,63

Tabelle 10: %-Grauwerte für β Untereinheit vom Komplex V Dimer (Spotnr.: 64)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	11,21	8,30	9,67	11,68	9,87
Kontrolle #2	12,45	12,22	9,18	7,84	9,52
Kontrolle #3	11,92	11,80	6,44	6,07	4,46
8 Gy #1	8,61	11,26	13,96	11,93	11,20
8 Gy #2	7,96	6,83	8,00	5,21	6,32
8 Gy #3	12,02	9,08	6,96	9,09	8,87

Tabelle 11: %-Grauwerte für β Untereinheit vom freiem F_1 -Teil der Komplex V (Spotnr.: 62)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	3,98	5,84	2,80	4,05	1,77
Kontrolle #2	2,60	2,15	1,19	1,12	2,41
Kontrolle #3	3,09	4,79	2,05	2,97	2,10
8 Gy #1	3,42	2,21	2,74	3,59	2,91
8 Gy #2	1,35	1,67	2,98	2,05	1,44
8 Gy #3	2,17	1,93	2,79	4,00	1,96

Tabelle 12: %-Grauwerte für γ Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spotnr.: 95)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	2,88	2,29	2,52	2,55	4,05
Kontrolle #2	2,54	3,66	2,49	2,51	2,78
Kontrolle #3	4,84	6,19	2,13	2,16	1,91
8 Gy #1	4,51	3,53	5,62	2,95	2,34
8 Gy #2	3,27	2,52	2,36	2,08	1,96
8 Gy #3	4,09	3,57	2,62	2,11	4,23

Tabelle 13: %-Grauwerte für b Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spotnr.: 96)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	3,20	2,63	3,31	2,81	3,96
Kontrolle #2	3,00	3,03	2,61	2,61	1,72
Kontrolle #3	3,49	7,65	1,89	1,92	1,93
8 Gy #1	4,29	2,95	4,05	2,64	2,47
8 Gy #2	2,81	2,05	2,00	1,51	1,56
8 Gy #3	3,77	3,17	2,62	2,49	3,39

Tabelle 14: %-Grauwerte für OSCP Untereinheit vom Komplex V Monomer (Spotnr.: 97)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	4,23	2,74	3,97	3,91	6,19
Kontrolle #2	3,35	4,74	2,72	2,65	4,00
Kontrolle #3	5,85	8,57	2,84	2,89	2,82
8 Gy #1	4,84	4,20	5,82	3,29	3,17
8 Gy #2	3,22	3,19	3,44	2,20	2,26
8 Gy #3	5,11	3,76	3,21	3,78	5,11

Tabelle 15: %-Grauwerte für OSCP Untereinheit vom Komplex V Dimer (Spotnr.: 99)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	3,48	1,99	2,61	2,43	2,81
Kontrolle #2	2,53	3,21	2,38	2,41	2,03
Kontrolle #3	7,05	3,46	1,88	2,01	1,60
8 Gy #1	2,60	2,54	4,14	2,23	2,16
8 Gy #2	2,49	1,66	2,65	1,32	1,49
8 Gy #3	1,55	2,30	1,98	2,64	2,32

Tabelle 16: %-Grauwerte für HSP60 (Spotnr.: 48)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	8,46	9,74	9,81	8,79	9,03
Kontrolle #2	6,21	8,35	5,30	5,58	9,10
Kontrolle #3	7,97	8,19	9,70	8,61	8,52
8 Gy #1	10,86	11,37	16,14	11,96	8,97
8 Gy #2	10,44	10,72	9,89	9,59	9,54
8 Gy #3	11,34	10,96	9,21	9,06	9,61

Tabelle 17: %-Grauwerte für HSP90 β (Spotnr.: 22)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	6,44	7,02	4,74	7,87	5,71
Kontrolle #2	4,14	5,89	3,96	4,24	4,56
Kontrolle #3	6,18	5,86	3,35	3,26	4,97
8 Gy #1	7,91	7,42	4,35	7,89	7,19
8 Gy #2	7,88	6,50	3,11	5,97	2,64
8 Gy #3	8,33	7,97	3,01	4,90	5,22

Tabelle 18: %-Grauwerte für HSP70 Hyuo1 (Spot 10)

	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 11	Tag 14
Kontrolle #1	9,79	8,02	13,69	12,30	13,65
Kontrolle #2	9,21	13,98	13,09	13,31	13,11
Kontrolle #3	8,12	12,38	8,11	7,13	9,58
8 Gy #1	7,75	8,27	12,47	9,78	10,34
8 Gy #2	10,43	7,41	8,30	6,27	7,84
8 Gy #3	10,05	7,54	9,13	8,25	11,22

Analyse der relativen Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe I und IV (Abschnitte 4.1.3 und 4.1.4):

Alle analysierten Gelbilder, wie auch Delta2D Projekte und Excel-Tabellen sind in der Arbeitsgruppe Dencher vorhanden.

In folgenden Tabellen sind die errechneten Steigungen der Grauwerte ($[\Delta V/\Delta t]$, Änderung der Grauwerte (ΔV) in eine bestimmte Zeitspanne (Δt), die bei der relativen Analyse der enzymatischen Aktivität der Komplexe I und IV der Atmungskette, in ihre individuellen Form und in Superkomplexen verwendet wurden, aufgeführt. Die Werte sind auf die erste Nachkommastelle aufgerundet worden.

Tabelle 19: Errechnete Steigung $[\Delta V/\Delta t]$ im Rahmen der Aktivitätsanalyse des individuellen Komplexes I.

		OLN-93 unbestrahlt (Kontrolle)	OLN-93 bestrahlt (8 Gy)
Tag 1	#1	0,9	0,3
	#2	5,5	2,4
	#3	0,4	0,2
Tag 4	#1	0,5	0,1
	#2	6,6	4,4
	#3	0,7	0,2
Tag 7	#1	1,5	1,1
	#2	11,4	5,0
	#3	0,7	0,6
Tag 11	#1	1,3	0,7
	#2	5,9	2,4
	#3	0,3	0,4
Tag 14	#1	1,1	0,2
	#2	6,5	1,4
	#3	0,5	0,1

Tabelle 20: Errechnete Steigung $[\Delta V/\Delta t]$ im Rahmen der Aktivitätsanalyse des Komplexes I in Superkomplexen.

		OLN-93 unbestrahlt (Kontrolle)	OLN-93 bestrahlt (8 Gy)
Tag 1	#1	11,6	5,9
	#2	35,5	31,3
	#3	12,1	9,3
Tag 4	#1	13,4	7,4
	#2	50,4	53,1
	#3	9,1	8,3
Tag 7	#1	15,9	9,2
	#2	76,8	51,4
	#3	14,8	9,7
Tag 11	#1	11,4	3,3
	#2	70,9	25,3
	#3	4,8	4,3
Tag 14	#1	10,1	2,4
	#2	42,1	19,7
	#3	3,6	2,6

Tabelle 21: Errechnete Steigung $[\Delta V/\Delta t]$ im Rahmen der Aktivitätsanalyse des individuellen Komplexes IV₂.

		OLN-93 unbestrahlt (Kontrolle)	OLN-93 bestrahlt (8 Gy)
Tag 1	#1	65,0	128,9
	#2	52,9	54,6
	#3	11,6	8,2
Tag 4	#1	87,8	102,3
	#2	51,4	104,5
	#3	4,2	12,6
Tag 7	#1	71,4	118,9
	#2	51,9	112,3
	#3	11,6	17,7
Tag 11	#1	63,5	53,9
	#2	70,7	54,0
	#3	12,7	6,6
Tag 14	#1	62,5	103,6
	#2	49,7	73,4
	#3	4,0	6,0

Tabelle 22: Errechnete Steigung $[\Delta V/\Delta t]$ im Rahmen der Aktivitätsanalyse des Komplexes IV in Superkomplexen.

		OLN-93 unbestrahlt (Kontrolle)	OLN-93 bestrahlt (8 Gy)
Tag 1	#1	78,6	96,6
	#2	25,7	85,3
	#3	1,3	8,2
Tag 4	#1	74,5	92,1
	#2	47,4	113,7
	#3	10,6	13,4
Tag 7	#1	49,0	141,5
	#2	30,4	92,6
	#3	5,8	13,4
Tag 11	#1	88,5	34,2
	#2	75,0	50,4
	#3	4,4	0,8
Tag 14	#1	26,0	42,5
	#2	47,9	50,2
	#3	8,5	4,7

Lipidom-Analyse (Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**):

Alle Einzelheiten zur Analyse der Membranfluidität mittels Fluoreszenz-Anisotropie, wie Etablierung der Methode in der Arbeitsgruppe Dencher, Vorexperimente, Einzelheiten zur Durchführung und verwendeten Chemikalien sind in der Masterarbeit von Frau Stefanie Kern (Kern, 2013b) aufgeführt.

Alle Excel-Tabellen sind in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. N. A. Dencher vorhanden.

Die Durchführung von massenspektrometrischer Identifizierung der Lipide an intakten Mitochondrien ist in Arbeiten von Frau Stefanie Kern (Kern, 2013b), Frau Christine Kern (Kern, 2013a) und Herr Michael Muschol (Muschol, 2014) genauer beschrieben.

Analyse von zellulären und mitochondrialen Aktivitäten (Abschnitt 4.3):

Alle Excel-Mappen, wie auch Messdaten zu Untersuchungen von zellulären und mitochondrialen Aktivitäten sind in der Arbeitsgruppe Dencher hinterlegt.

Literaturverzeichnis

Introducing Scepter™ 2.0 Cell Counter, Millipore 2011.

Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628.

Acin-Perez, R., Gatti, D.L., Bai, Y., Manfredi, G., 2011. Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell metabolism* 13, 712-719.

Adams, G.E., Hasan, N.M., Joiner, M.C., 1997. The Klaas Breur Lecture. Radiation, hypoxia and genetic stimulation: implications for future therapies. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 44, 101-109.

Andersson, S.G., Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G., 2003. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358, 165-177; discussion 177-169.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry. Biokhimiia* 70, 200-214.

Angelini, R., Babudri, F., Lobasso, S., Corcelli, A., 2010. MALDI-TOF/MS analysis of archaeobacterial lipids in lyophilized membranes dry-mixed with 9-aminoacridine. *Journal of lipid research* 51, 2818-2825.

Angelini, R., Vitale, R., Patil, V.A., Cocco, T., Ludwig, B., Greenberg, M.L., Corcelli, A., 2012. Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS. *Journal of lipid research* 53, 1417-1425.

Ardyanto, T.D., Osaki, M., Tokuyasu, N., Nagahama, Y., Ito, H., 2006. CoCl₂-induced HIF-1α expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: a possible role for the PI3K/Akt pathway. *International journal of oncology* 29, 549-555.

Arnold, S., Goglia, F., Kadenbach, B., 1998. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *European journal of biochemistry / FEBS* 252, 325-330.

Arrington, D.D., Schnellmann, R.G., 2008. Targeting of the molecular chaperone oxygen-regulated protein 150 (ORP150) to mitochondria and its induction by cellular stress. *American journal of physiology. Cell physiology* 294, C641-650.

Arya, R., Mallik, M., Lakhotia, S.C., 2007. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *Journal of biosciences* 32, 595-610.

Azakli, M., 2013. Einfluss ionisierender Strahlung und membran-aktiver Peptide auf Säugetierzellen sowie das Proteom von Mitochondrien. TU-Darmstadt.

Bajic, A., Spasic, M., Andjus, P.R., Savic, D., Parabucki, A., Nikolic-Kokic, A., Spasojevic, I., 2013. Fluctuating vs. continuous exposure to H₂O₂: the effects on mitochondrial membrane potential, intracellular calcium, and NF-κB in astroglia. *PLoS ONE* 8, e76383.

Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N.J., Perl, A., 1999. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *Journal of immunology* 162, 1466-1479.

-
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., 2001. Regulation of cytochrome c oxidase by adenylic nucleotides. Is oxidative phosphorylation feedback regulated by its end-products? *IUBMB life* 52, 143-152.
- Bellance, N., Lestienne, P., Rossignol, R., 2009. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in bioscience* 14, 4015-4034.
- Bender, R., Ziegler, A., Lange, S., 2007. [Analysis of variance]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 132 Suppl 1, e57-60.
- Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P., Patton, W.F., 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21, 2509-2521.
- Bevilacqua, E., Gomes, S.Z., Lorenzon, A.R., Hoshida, M.S., Amarante-Paffaro, A.M., 2012. NADPH oxidase as an important source of reactive oxygen species at the mouse maternal-fetal interface: putative biological roles. *Reproductive biomedicine online* 25, 31-43.
- Blake, R., Trounce, I.A., 2013. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochimica et biophysica acta*.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2, 1-6.
- Bortz, J., 2013. *Statistik: Für Sozialwissenschaftler*. Springer Berlin Heidelberg.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* 128, 617-630.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brookes, P.S., Darley-Usmar, V.M., 2004. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286, H39-46.
- Brown, D., 2002. Structure and function of membrane rafts. *International journal of medical microbiology : IJMM* 291, 433-437.
- Burkart, W., Jung, T., Frasch, G., 1999. Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 322, 89-101.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11, 85-95.
- Canevari, L., Clark, J.B., Bates, T.E., 1999. beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS letters* 457, 131-134.
- Carbajo, R.J., Kellas, F.A., Runswick, M.J., Montgomery, M.G., Walker, J.E., Neuhaus, D., 2005. Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit. *Journal of molecular biology* 351, 824-838.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

-
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2003. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 2, 117-126.
- Chachami, G., Simos, G., Hatziefthimiou, A., Bonanou, S., Molyvdas, P.A., Paraskeva, E., 2004. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 31, 544-551.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T., 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *The Journal of biological chemistry* 275, 25130-25138.
- Che, R., Yuan, Y., Huang, S., Zhang, A., 2013. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *American journal of physiology. Renal physiology*.
- Chen, K., Xu, X., Kobayashi, S., Timm, D., Jepperson, T., Liang, Q., 2011. Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose antagonizes doxorubicin-induced cardiomyocyte death by multiple mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 286, 21993-22006.
- Chicco, A.J., Sparagna, G.C., 2007. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *American journal of physiology. Cell physiology* 292, C33-44.
- Cho, Y.E., Singh, T.S., Lee, H.C., Moon, P.G., Lee, J.E., Lee, M.H., Choi, E.C., Chen, Y.J., Kim, S.H., Baek, M.C., 2012. In-depth identification of pathways related to cisplatin-induced hepatotoxicity through an integrative method based on an informatics-assisted label-free protein quantitation and microarray gene expression approach. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 11, M111.010884.
- Cooper, C.E., Davies, N.A., 2000. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on the cytochrome oxidase K(m) for oxygen: implications for mitochondrial pathology. *Biochimica et biophysica acta* 1459, 390-396.
- Csermely, P., 2004. Strong links are important, but weak links stabilize them. *Trends in biochemical sciences* 29, 331-334.
- Cui, X., 2012. Reactive oxygen species: the achilles' heel of cancer cells? *Antioxidants & redox signaling* 16, 1212-1214.
- Curry, J.M., Sprandio, J., Cognetti, D., Luginbuhl, A., Bar-ad, V., Pribitkin, E., Tuluc, M., 2014. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Seminars in oncology* 41, 217-234.
- Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N., Brouillet, E., 2010. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1802, 52-61.
- Datta, K., Hyduke, D.R., Suman, S., Moon, B.H., Johnson, M.D., Fornace, A.J., Jr., 2012. Exposure to ionizing radiation induced persistent gene expression changes in mouse mammary gland. *Radiation oncology* 7, 205.
- De Maio, A., 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock (Augusta, Ga.)* 11, 1-12.
- Dencher, N.A., 1990. *In Dynamics and Biogenesis of Membranes*. Springer-Verlag, pp. 343-360.
- Dencher, N.A., Frenzel, M., Reifschneider, N.H., Sugawa, M., Krause, F., 2007. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 291-298.
-

-
- Dikalov, S., Griending, K.K., Harrison, D.G., 2007. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49, 717-727.
- Dimauro, S., Mancuso, M., Naini, A., 2004. Mitochondrial encephalomyopathies: therapeutic approach. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011, 232-245.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., 2010. Nuclear genome size: are we getting closer? *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77, 635-642.
- Dong, J.C., Cheng, G.H., Shan, Y.X., Wu, N., Shao, M.L., Li, P.W., Jin, S.Z., 2014. Role of PLC-PIP2 and cAMP-PKA signal pathways in radiation-induced immune-suppressing effect. *Biomedical and environmental sciences : BES* 27, 27-34.
- Faried, A., Sohda, M., Nakajima, M., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H., 2004. Expression of heat-shock protein Hsp60 correlated with the apoptotic index and patient prognosis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 40, 2804-2811.
- Feniouk, B.A., Junge, W., 2005. Regulation of the F0F1-ATP synthase: the conformation of subunit epsilon might be determined by directionality of subunit gamma rotation. *FEBS letters* 579, 5114-5118.
- Fernandez, D., Perl, A., 2009. Metabolic control of T cell activation and death in SLE. *Autoimmunity reviews* 8, 184-189.
- Frenzel, M., 2011. Mitochondrial ageing in rat brain areas and human fibroblasts. *TU Darmstadt*.
- Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M.D., Dencher, N.A., 2010. Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Experimental gerontology* 45, 563-572.
- Gabai, V.L., Budagova, K.R., Sherman, M.Y., 2005. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene* 24, 3328-3338.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G., 2012. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation research* 111, 1198-1207.
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2000. The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature structural biology* 7, 1055-1061.
- Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J.P., Velours, J., 2002. Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochimica et biophysica acta* 1555, 174-180.
- Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F., 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242, 1412-1415.
- Gray, G.D., Wickstrom, E., 1996. Evaluation of anchorage-independent proliferation in tumorigenic cells using the redox dye alamarBlue. *BioTechniques* 21, 780,782.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Haines, T.H., Dencher, N.A., 2002. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters* 528, 35-39.
- Hall, E.J., Giaccia, A.J., 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Halliwell, B., 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *The Biochemical journal* 401, 1-11.
-

-
- Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 10, 5-12.
- Hammond, E.M., Asselin, M.C., Forster, D., O'Connor, J.P., Senra, J.M., Williams, K.J., 2014. The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. *Clinical oncology* 26, 277-288.
- Harris, A.L., 2002. Hypoxia [mdash] a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2, 38-47.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Hartmann, T., 2014. *Fachwissen MTRA : Für Ausbildung, Studium und Beruf*. Springer.
- Horowitz, A., Simons, M., 2008. Branching morphogenesis. *Circulation research* 103, 784-795.
- Hosokawa, Y., Suzuki, H., Toda, H., Nishikimi, M., Ozawa, T., 1989. Complementary DNA encoding core protein II of human mitochondrial cytochrome bc₁ complex. Substantial diversity in deduced primary structure from its yeast counterpart. *The Journal of biological chemistry* 264, 13483-13488.
- Hosoki, A., Yonekura, S., Zhao, Q.L., Wei, Z.L., Takasaki, I., Tabuchi, Y., Wang, L.L., Hasuike, S., Nomura, T., Tachibana, A., Hashiguchi, K., Yonei, S., Kondo, T., Zhang-Akiyama, Q.M., 2012. Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells. *Journal of radiation research* 53, 58-71.
- International Commission on Radiation Units and Measurements., 1970. Linear energy transfer.
- Iuso, A., Scacco, S., Piccoli, C., Bellomo, F., Petruzzella, V., Trentadue, R., Minuto, M., Ripoli, M., Capitanio, N., Zeviani, M., Papa, S., 2006. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *The Journal of biological chemistry* 281, 10374-10380.
- Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K.O., Zink, D., Durante, M., Lobrich, M., Taucher-Scholz, G., 2011. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic acids research* 39, 6489-6499.
- Jordan, B.F., Sonveaux, P., 2012. Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Frontiers in pharmacology* 3, 94.
- Kadenbach, B., 1986. Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 18, 39-54.
- Kagan, V.E., Chu, C.T., Tyurina, Y.Y., Cheikhi, A., Bayir, H., 2013. Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chemistry and physics of lipids*.
- Kaiser, R.D., London, E., 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37, 8180-8190.
- Kaludercic, N., Deshwal, S., Di Lisa, F., 2014. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Frontiers in physiology* 5, 285.
- Kam, W.W., Banati, R.B., 2013. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free radical biology & medicine* 65, 607-619.
- Ke, Q., Costa, M., 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology* 70, 1469-1480.

Kern, C., 2013a. Biological effects of ionizing radiation on the permanent cell lines OLN-93 and SH-SY5Y TU Darmstadt.

Kern, S., 2013b. Biochemical and biophysical characterization of biological membranes. TU Darmstadt.

Kim, L.S., Kim, J.H., 2011. Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics. *Journal of breast cancer* 14, 167-174.

Klimova, T.A., Bell, E.L., Shroff, E.H., Weinberg, F.D., Snyder, C.M., Dimri, G.P., Schumacker, P.T., Budinger, G.R., Chandel, N.S., 2009. Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 783-794.

Kotiadis, V.N., Duchen, M.R., Osellame, L.D., 2014. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 1254-1265.

Krause, F., 2006. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* 27, 2759-2781.

Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S., Dencher, N.A., 2005. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 329, 583-590.

Krause, F., Seelert, H., 2008. Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Chapter 14, Unit 14.11.*

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87, 99-163.

Kuzmenko, A.V., Levitskii, S.A., Vinogradova, E.N., Atkinson, G.C., Hauryliuk, V., Zenkin, N., Kamenski, P.A., 2013. Protein biosynthesis in mitochondria. *Biochemistry. Biokhimiia* 78, 855-866.

Lande, M.B., Donovan, J.M., Zeidel, M.L., 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *The Journal of general physiology* 106, 67-84.

Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B., 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer research* 61, 3894-3901.

Lee, J.H., Choi, S.H., Baek, M.W., Kim, M.H., Kim, H.J., Kim, S.H., Oh, S.J., Park, H.J., Kim, W.J., Jung, J.Y., 2013. CoCl₂ induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells. *Molecular and cellular biochemistry* 379, 133-140.

Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H., Kim, K.W., 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)α: its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine* 36, 1-12.

Lentz, B.R., 1993. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chemistry and physics of lipids* 64, 99-116.

Leong, D.W., Komen, J.C., Hewitt, C.A., Arnaud, E., McKenzie, M., Phipson, B., Bahlo, M., Laskowski, A., Kinkel, S.A., Davey, G.M., Heath, W.R., Voss, A.K., Zahedi, R.P., Pitt, J.J., Chrast, R., Sickmann, A., Ryan, M.T., Smyth, G.K., Thorburn, D.R., Scott, H.S., 2012.

Proteomic and metabolomic analyses of mitochondrial complex I-deficient mouse model generated by spontaneous B2 short interspersed nuclear element (SINE) insertion into NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) gene. *The Journal of biological chemistry* 287, 20652-20663.

Liscum, L., Munn, N.J., 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochimica et biophysica acta* 1438, 19-37.

Little, J.B., 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 397-404.

Lowik, C.W., Alblas, M.J., van de Ruit, M., Papapoulos, S.E., van der Pluijm, G., 1993. Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red. *Analytical biochemistry* 213, 426-433.

Luo, W., Rodina, A., Chiosis, G., 2008. Heat shock protein 90: translation from cancer to Alzheimer's disease treatment? *BMC neuroscience* 9 Suppl 2, S7.

Lyng, H., Sundfor, K., Trope, C., Rofstad, E.K., 2000. Disease control of uterine cervical cancer: relationships to tumor oxygen tension, vascular density, cell density, and frequency of mitosis and apoptosis measured before treatment and during radiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 1104-1112.

Malatesta, F., Antonini, G., Sarti, P., Brunori, M., 1987. Modulation of cytochrome oxidase activity by inorganic and organic phosphate. *The Biochemical journal* 248, 161-165.

Mason, E.F., Rathmell, J.C., 2011. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 645-654.

Mayeur, S., Lancel, S., Theys, N., Lukaszewski, M.A., Duban-Deweere, S., Bastide, B., Hachani, J., Cecchelli, R., Breton, C., Gabory, A., Storme, L., Reusens, B., Junien, C., Vieau, D., Lesage, J., 2013. Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 304, E14-22.

Mileykovskaya, E., Dowhan, W., 2009. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 2084-2091.

Modha, K., Whiteside, J.P., Spier, R.E., 1993. The determination of cellular viability of hybridoma cells in microtitre plates: a colorimetric assay based on neutral red. *Cytotechnology* 13, 227-232.

Muschol, M., 2014. Analyse der Enzymaktivitäten von OxPhos-Komplexen / Superkomplexen und Veränderungen des mitochondrialen Proteoms in Bezug auf Alter und Kalorienrestriktion. TU-Darmstadt.

Nagy, G., Koncz, A., Fernandez, D., Perl, A., 2007. Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. *Free radical biology & medicine* 42, 1625-1631.

Nemoto, T., Sato, N., 1998. Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *The Biochemical journal* 330 (Pt 2), 989-995.

O'Rourke, B., Blatter, L.A., 2009. Mitochondrial Ca²⁺ uptake: tortoise or hare? *Journal of molecular and cellular cardiology* 46, 767-774.

Orecchia, R., Fossati, P., Rossi, S., 2009. The National Center for Oncological Hadron Therapy: status of the project and future clinical use of the facility. *Tumori* 95, 169-176.

Ou, J.R., Tan, M.S., Xie, A.M., Yu, J.T., Tan, L., 2014. Heat Shock Protein 90 in Alzheimer's Disease. *BioMed research international* 2014, 796869.

Ozawa, K., Tsukamoto, Y., Hori, O., Kitao, Y., Yanagi, H., Stern, D.M., Ogawa, S., 2001. Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Cancer research* 61, 4206-4213.

Packer, L., Fuehr, K., 1977. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423-425.

Palomera-Sanchez, Z., Zurita, M., 2011. Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA repair* 10, 119-125.

Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S., 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO journal* 19, 4310-4322.

Papa, S., De Rasmio, D., 2013. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends in molecular medicine* 19, 61-69.

Pappova, N., Siracka, E., Vacek, A., Durkovsky, J., 1982. Oxygen tension and prediction of the radiation response. Polarographic study in human breast cancer. *Neoplasma* 29, 669-674.

Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M., 2011. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochemistry international* 58, 447-457.

Park, M.T., Kim, M.J., Kang, Y.H., Choi, S.Y., Lee, J.H., Choi, J.A., Kang, C.M., Cho, C.K., Kang, S., Bae, S., Lee, Y.S., Chung, H.Y., Lee, S.J., 2005. Phytosphingosine in combination with ionizing radiation enhances apoptotic cell death in radiation-resistant cancer cells through ROS-dependent and -independent AIF release. *Blood* 105, 1724-1733.

Patton, W.F., 2000. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* 21, 1123-1144.

Prendergast, F.G., Haugland, R.P., Callahan, P.J., 1981. 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. *Biochemistry* 20, 7333-7338.

Prithivirajasingh, S., Story, M.D., Bergh, S.A., Geara, F.B., Ang, K.K., Ismail, S.M., Stevens, C.W., Buchholz, T.A., Brock, W.A., 2004. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS letters* 571, 227-232.

Radreau, P., Rhodes, J.D., Mithen, R.F., Kroon, P.A., Sanderson, J., 2009. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) pathway activation by quercetin in human lens epithelial cells. *Experimental eye research* 89, 995-1002.

Rampersad, S.N., 2012. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors* 12, 12347-12360.

Rana, P., Anson, B., Engle, S., Will, Y., 2012. Characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: bioenergetics and utilization in safety screening. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130, 117-131.

Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A., Krause, F., 2006. Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *Journal of proteome research* 5, 1117-1132.

Rexroth, S., Poetsch, A., Rogner, M., Hamann, A., Werner, A., Osiewacz, H.D., Schafer, E.R., Seelert, H., Dencher, N.A., 2012. Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et biophysica acta* 1817, 381-387.

Richter-Landsberg, C., Heinrich, M., 1996. OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *Journal of neuroscience research* 45, 161-173.

Roots, R., Holley, W., Chatterjee, A., Rachal, E., Kraft, G., 1989. The influence of radiation quality on the formation of DNA breaks. *Advances in space research : the official journal of the Committee on Space Research* 9, 45-55.

Roots, R., Okada, S., 1972. Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 21, 329-342.

Ross, G.M., 1999. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer* 6, 41-44.

Saito, H., Hammond, A.T., Moses, R.E., 1995. The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Experimental cell research* 217, 272-279.

Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cossarizza, A., 1997. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS letters* 411, 77-82.

Schafer, E., Dencher, N.A., Vonck, J., Parcej, D.N., 2007. Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 46, 12579-12585.

Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., Vonck, J., 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry* 281, 15370-15375.

Schäfer, E.R., 2011. Massenspektrometrische und gelelektrophoretische Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von Modellorganismen. TU-Darmstadt.

Schagger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal* 19, 1777-1783.

Schagger, H., von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* 199, 223-231.

Schatz, G., 2006. *Jeff's views on science and scientists*. Elsevier.

Scheffler, I.E., 2001. Mitochondria make a come back. *Advanced drug delivery reviews* 49, 3-26.

Schilling-Toth, B., Sandor, N., Kis, E., Kadhim, M., Safrany, G., Hegyesi, H., 2011. Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation. *Mutation research* 716, 33-39.

Schlegel, S., Klepsch, M., Wickstrom, D., Wagner, S., de Gier, J.W., 2010. Comparative analysis of cytoplasmic membrane proteomes of *Escherichia coli* using 2D blue native/SDS-PAGE. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 619, 257-269.

Seelert, H., Dani, D.N., Dante, S., Hauss, T., Krause, F., Schafer, E., Frenzel, M., Poetsch, A., Rexroth, S., Schwassmann, H.J., Suhai, T., Vonck, J., Dencher, N.A., 2009. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 657-671.

Sharpe, M., Perin, I., Wrigglesworth, J., Nicholls, P., 1996. Fatty acids as modulators of cytochrome c oxidase in proteoliposomes. *The Biochemical journal* 320 (Pt 2), 557-561.

-
- Shinitzky, M., Barenholz, Y., 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochimica et biophysica acta* 515, 367-394.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Skulachev, V.P., 1996. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quarterly reviews of biophysics* 29, 169-202.
- Skulachev, V.P., 2013. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications* 441, 275-279.
- Sugawa, M., Coper, H., Schulze, G., Yamashina, I., Krause, F., Dencher, N.A., 1996. Impaired plasticity of neurons in aging. *Biochemical, biophysical, and behavioral studies. Annals of the New York Academy of Sciences* 786, 274-282.
- Sullivan, M., Galea, P., Latif, S., 2006. What is the appropriate oxygen tension for in vitro culture? *Molecular human reproduction* 12, 653.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371-372.
- Tan, A.S., Baty, J.W., Berridge, M.V., 2013. The role of mitochondrial electron transport in tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et biophysica acta*.
- Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews. Genetics* 6, 389-402.
- Thilmany, S., 2013. Das mitochondriale Proteom von *Rattus norvegicus* in Abhängigkeit von Alter und Kalorienrestriktion. TU-Darmstadt.
- Tiede, L.M., Cook, E.A., Morsey, B., Fox, H.S., 2011. Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell death & disease* 2, e246.
- Tominaga, H., Kodama, S., Matsuda, N., Suzuki, K., Watanabe, M., 2004. Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *Journal of radiation research* 45, 181-188.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144.
- Veereshwarayya, V., Kumar, P., Rosen, K.M., Mestril, R., Querfurth, H.W., 2006. Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular beta-amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 29468-29478.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* 1, 945-951.
- Walther, D.M., Rapaport, D., 2009. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 42-51.
- Wang, L., Kuwahara, Y., Li, L., Baba, T., Shin, R.W., Ohkubo, Y., Ono, K., Fukumoto, M., 2007. Analysis of Common Deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation. *International journal of radiation biology* 83, 433-442.
- Weber, J., 2006. ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 1162-1170.
-

Weber, U., 1996. Volumenkonforme Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen zur Vorbereitung einer Strahlentherapie.

Wernicke, C., Hellmann, J., Zieba, B., Kuter, K., Ossowska, K., Frenzel, M., Dencher, N.A., Rommelspacher, H., 2010. 9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacological reports* : PR 62, 35-53.

Wheelock, A.M., Morin, D., Bartosiewicz, M., Buckpitt, A.R., 2006. Use of a fluorescent internal protein standard to achieve quantitative two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 6, 1385-1398.

Williams, P.M., Fletcher, S., 2010. Health effects of prenatal radiation exposure. *American family physician* 82, 488-493.

Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M., Schagger, H., 2006. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 1066-1072.

Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M., Schagger, H., 2007. Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28, 3811-3820.

Wittig, I., Schagger, H., 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et biophysica acta* 1777, 592-598.

Wittig, I., Velours, J., Stuart, R., Schagger, H., 2008. Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 7, 995-1004.

Wu, J., Wang, W., Shao, Q., Xiao, G., Cheng, J., Yuan, Y., Zhang, M., 2014. Irradiation facilitates the inhibitory effect of the heat shock protein 90 inhibitor NVP-BEP800 on the proliferation of malignant glioblastoma cells through attenuation of the upregulation of heat shock protein 70. *Experimental and therapeutic medicine* 8, 893-898.

Yoshimura, M., Itasaka, S., Harada, H., Hiraoka, M., 2013. Microenvironment and radiation therapy. *BioMed research international* 2013, 685308.

Zhou, D., Shao, L., Spitz, D.R., 2014. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Advances in cancer research* 122, 1-67.

Zolzer, F., Streffer, C., 2002. Increased radiosensitivity with chronic hypoxia in four human tumor cell lines. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 54, 910-920.

Zor, T., Selinger, Z., 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical biochemistry* 236, 302-308.



Tagungsbeiträge

Poster

Lidija Cavlovic, Victoria Decker, Meral Azakli, Christine Kern, Norbert A. Dencher

Functional and proteomic comparison of rat oligodendroglia cell line OLN-93 and human neuroblastoma cell line SH-SY5Y as model systems for the influence of X-ray radiation and amyloid-beta peptides

64. Mosbacher Kolloquium „Membranes in motion“ Mosbach, 2013

Lidija Cavlovic, Michael Muschol, Christine Kern, Norbert A. Dencher

Differences in protein expression and protein activities in mitochondria of OLN-93 cells after irradiation with X-ray (Poster)

16th Annual Meeting of the GBS, Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Darmstadt, 2013

Lidija Cavlovic, Michael Muschol, Christine Kern, Norbert A. Dencher

Differences in protein expression and protein activities in mitochondria of OLN-93 cells after irradiation with X-ray

GBM Tagung „Molecular life sciences“ Frankfurt, 2013



Cavlovic Lidija
Jahnstr. 62
60318 Frankfurt

Frankfurt, den 11. Mai 2015

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Lidija Cavlovic



Cavlovic Lidija
Jahnstr. 62
60318 Frankfurt

Frankfurt, den 11. Mai 2015

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Lidija Cavlovic



Lebenslauf

Nachname, Vorname

CAVLOVIC, LIDIJA

Adresse

Jahnstrasse 62
60318 Frankfurt, Deutschland
LidijaCavlovic@aol.com

Nationalität

Kroatisch

Geburtsdatum/Geburtsort

04. September 1979/ Sanski Most, Bosnien und Herzegowina

Ausbildung

2011-2015

Promotionsstudium, Fach: Chemie an der Technische Universität Darmstadt

Thema der Promotion: „Wirkung von ionisierender Strahlung auf Proteom und Lipidom sowie auf zelluläre und mitochondriale Aktivität“
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. A. Dencher

2004 -2010

Hochschulausbildung, Fach: Biochemie an der Goethe Universität, Frankfurt

Abschluss

Diplom in Biochemie, Oktober 2010
Vordiplom, April 2006

Thema der Diplomarbeit: „Wirkung der Onkogene *EVI1* und *MDS1-EVI1* auf die genomische Stabilität hämatopoetischer Zellen“
Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

2003

Studienkolleg

Feststellungsprüfung in den Fächern: Deutsch, Mathematik, Physik, Biologie und Chemie
Goethe Universität, Frankfurt

1994 -1998

Gymnasium

Abschluss

Allgemeines Abitur
erste Klasse in der „Srednjoskolski Centar-Sanski Most“, Sanski Most, Bosnien und Herzegowina; weitere Schuljahre und Abitur an der „Srednja skola Novska“; Novska, Kroatien

1986 - 1994

Grundschule

Grundschule „Vuk Karadzic“ Sanski Most, Bosnien und Herzegowina

Frankfurt am Main, 11. Mai 2015

Lidija Cavlovic
